

---

## **Relatório de Estágio: "Desenvolvimento de Métodos para a Determinação de Princípios Ativos em Inseticidas, Usando Cromatografia Gasosa"**

Relatório de Estágio apresentado para a obtenção do grau de Mestre  
em Processos Químicos e Biológicos

**Autor**

**Cristina Isabel Quental Ribeiro**

**Orientadores**

**Doutora Maria Nazaré Coelho Marques Pinheiro**

Professora Coordenadora, ISEC

**Doutor Luís Miguel Moura Neves de Castro**

Professor Adjunto, ISEC

**Supervisor na Empresa**

**Dr<sup>a</sup> Susana Leite**

Diretora Técnica / Grupo de produtos de abastecimento, COLEP Vale de Cambra

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

**Coimbra, Dezembro, 2013**

## AGRADECIMENTOS

À empresa COLEP pela oportunidade e disponibilidade concedida para a realização do estágio.

À Dr<sup>a</sup> Susana Leite pela dedicação, orientação, apoio e simpatia ao longo do estágio.

Aos professores Doutora Nazaré Pinheiro e ao Doutor Luís Castro por todo o seu empenho, sabedoria, dedicação e disponibilidade.

A todos os colegas de laboratório da empresa COLEP, nomeadamente ao Urbano, à Anita, ao Paulo, à Teresa e à Isabel, pela boa disposição e entreaajuda gerada no ambiente de trabalho, que o tornava mais agradável e entusiasmante.

À Cristiana Ferreira por toda a ajuda, apoio e disponibilidade durante o estágio em todos os problemas que encontrei.

Agradeço também aos meus amigos de infância especialmente à Diana Mendes, e amigos de curso, nomeadamente à Carla Simões, à Irene Carvalho, ao Carlos Gonçalo e ao Hugo Abreu por todo o apoio, preocupação, confiança e amizade disponibilizados durante este percurso.

Ao Cândido Gradim que esteve presente ao longo deste ano e que acreditou sempre em mim mesmo nas horas em que eu mesma já não acreditava e por apostar na minha capacidade. Obrigada pela força, apoio emocional, principalmente pela paciência, pela bondade e por tudo o que representas para mim.

Por último, e mais importante, porque tenho a consciência que sozinha nada seria possível, um agradecimento especial aos meus pais e irmão que são a base da minha vida e moldes de coragem, pelo carinho e compreensão nas fases boas e menos boas, pelo incentivo incansável, apoio incondicional, amizade, paciência e ajuda na superação de obstáculos, tanto a nível académico, como a nível pessoal. A eles dedico este trabalho!

## RESUMO

O presente relatório reporta as atividades desenvolvidas no âmbito do estágio curricular do Mestrado em Processos Químicos e Biológicos do DEQB (Departamento de Engenharia Química e Biológica) do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, que foi realizado em ambiente empresarial, na empresa COLEP, sediada em Vale de Cambra. O objetivo do trabalho realizado consistiu na quantificação de princípios ativos em inseticidas, tendo-se, para o efeito, desenvolvido métodos analíticos recorrendo à cromatografia gasosa utilizando um detetor de ionização de chama. No plano de trabalhos inicialmente definido estava previsto o desenvolvimento de um método de análise da deltametrina em dois inseticidas diferentes. Posteriormente, para dar resposta às necessidades da empresa, foram também desenvolvidos novos métodos de análise de inseticidas que chegavam à empresa para primeira produção.

Os inseticidas estudados no âmbito do presente estágio (inseticidas piretróides) pertencem ao grupo de inseticidas botânicos.

Foram desenvolvidos dois métodos para a determinação do princípio ativo deltametrina nos inseticidas dos clientes *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*, tendo-se obtido uma percentagem em massa de  $(0,0330 \pm 0,0003045) \%$  e  $(0,0318 \pm 0,001105) \%$ , respetivamente, encontrando-se o último valor fora das especificações requeridas pelo cliente. Para a validação destes métodos analíticos determinaram-se alguns parâmetros, nomeadamente, gama de trabalho/linearidade, limites de deteção e quantificação, sensibilidade, precisão e exatidão.

Os inseticidas para primeira produção foram fornecidos por dois clientes, *Aragon* e *Rentokil*, tendo-se desenvolvido para ambos, métodos analíticos para quantificação dos correspondentes princípios ativos. O inseticida *Aragon I* incluía na sua constituição quatro princípios ativos, o butóxido de piperonilo, neopinamina, permetrina e cipermetrina tendo-se obtido uma percentagem mássica no inseticida de  $(0,613 \pm 0,0076) \%$ ,  $(0,188 \pm 0,0103) \%$ ,  $(0,422 \pm 0,0124) \%$  e  $(0,385 \pm 0,0185) \%$ , respetivamente. O segundo inseticida do cliente *Aragon* (*Aragon II*) com um princípio ativo adicional, o bendiocarbe, apresentou como composição mássica  $(0,910 \pm 0,0295) \%$  de butóxido de piperonilo,  $(0,388 \pm 0,00085) \%$  de permetrina,  $(0,283 \pm 0,00062) \%$  de neopinamina,  $(0,423 \pm 0,00306) \%$  de cipermetrina e  $(0,740 \pm 0,0357) \%$  de bendiocarbe. Os inseticidas do cliente *Rentokil*, o *Rentokil I* e o *Rentokil II* possuíam princípios ativos diferentes. O princípio ativo do primeiro, permetrina, estava presente no inseticida com uma percentagem mássica de  $(0,241 \pm 0,0036) \%$ . A percentagem, em massa, do princípio ativo presente no *Rentokil II*, a deltametrina, foi de  $(0,033 \pm 0,000248) \%$ .

**Palavras-Chave:** Inseticidas, piretróides, deltametrina cromatografia gasosa, detetor de ionização de chama, deltametrina, butóxido de piperonilo, neopinamina, permetrina, cipermetrina e bendiocarbe.

## ABSTRACT

The present report related the activities developed in the internship inserted on the Process Biological and Chemical Master in Biological and Chemical Engineer Department of Superior Institute Engineer of Coimbra, that internship was realized in business environment, in the enterprise COLEP, located in Vale de Cambra.

The objective of the work consisted in quantifying the active ingredients in insecticides, having developed, to that end, analytical methods using gas chromatography by flame ionization detector. In the initially work plan was defined the development of one analysis method of deltamethrin on two different insecticides. Later, to give response the company needs, were also developed new analysis methods of insecticides that arrived to the company for a first production.

The insecticides studied under this stage (pyrethroids insecticides) belong to the group of botanical insecticides.

Two methods were developed to set the active ingredient deltamethrin in the client's insecticides *Sinclair* and *Gerhardt Pharmaceuticals* clients, yielding a percentage by mass of  $(0.0330 \pm 0.0003,045)\%$  and  $(0.0318 \pm 0.001105)\%$ , respectively, finding the last value outside the required specifications by the client. For the validation of those analytical methods were determined some parameters, namely, the working range/linearity, limits of detection and quantification, sensitivity, precision and accuracy.

The insecticides for first production were provided by two clients, *Aragon* and *Rentokil*, having been developed for both analytical methods for quantification of their active principles methods. The insecticide *Aragon I* includes in their constitution four active principles, piperonyl butoxide, neopinamin, permethrin and cypermethrin yielding a weight percentage of the insecticide  $(0.613 \pm 0.0076)\%$ ,  $(0.188 \pm 0.0103)\%$ ,  $(0.422 \pm 0.0124)\%$  and  $(0.385 \pm 0.0185)\%$ , respectively. The second client's insecticide, *Aragon (Aragon II)* with an additional active ingredient, bendiocarb, as presented as mass composition  $(0.910 \pm 0.0295)\%$  of piperonyl butoxide  $(0.388 \pm 0.00085)\%$  permethrin  $(0.283 \pm 0.00062)\%$  of neopinamin  $(0.00306 \pm 0.423)\%$  and cypermethrin  $(0.740 \pm 0.0357)\%$  of bendiocarb. Insecticides of Rentokil's client, the Rentokil *Rentokil I* and *Rnetokil II* had different active ingredients. The first's active ingredient, permethrin, was present in the insecticide, with a percentage by weight of  $(0.241 \pm 0.0036)\%$ . The percentage by weight of the active ingredient present in *Rentokil II*, deltamethrin, was  $(0.033 \pm 0.000248)\%$ .

**Keywords:** Insecticides, pyrethroids, gas chromatography, flame ionization detector, deltamethrin, piperonyl butoxide, neopinamin, permethrin, cypermethrin, bendiocarb.



## ÍNDICE

1.	Introdução .....	1
1.1.	Objetivo .....	1
1.2.	Organização do Relatório de Estágio .....	1
1.3.	Apresentação da Empresa .....	2
1.3.1.	Missão, Visão e Valores da Empresa .....	3
1.3.2.	Volume de Negócios da COLEP .....	4
1.3.3.	Empresa COLEP de Vale de Cambra .....	5
1.4.	Secção de Enchimento da fábrica COLEP de Vale de Cambra .....	5
2.	Aerossóis .....	9
2.1.	Processo de Enchimento de aerossóis .....	10
3.	Inseticidas .....	13
3.1.	Inseticidas Sintéticos Orgânicos .....	13
3.2.	Inseticidas Inorgânicos .....	14
3.3.	Inseticidas Botânicos .....	14
3.4.	Agentes Biológicos .....	24
3.5.	Inseticidas Estudados .....	25
4.	Método de Análise para quantificação de princípios ativos em inseticidas .....	29
4.1.	Cromatografia Gasosa .....	29
5.	Desenvolvimento e validação dos métodos .....	35
5.1.	Especificidade/Seletividade .....	38
5.2.	Quantificação .....	38
5.3.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação .....	39
5.4.	Sensibilidade .....	40
5.5.	Precisão .....	41
5.6.	Exatidão .....	42
5.7.	Robustez .....	43

6.	Execução Experimental e discussão de resultados .....	45
6.1.	Melhoramento e validação do método de determinação do teor da deltametrina aplicado aos inseticidas <i>Sinclair</i> e <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> .....	45
6.1.1.	Reagentes, Material e Equipamento.....	45
6.1.2.	Condições de operação usadas na análise cromatográfica .....	47
6.1.3.	Determinação da percentagem de princípio ativo no método desenvolvido para o inseticida <i>Sinclair</i> .....	50
6.1.4.	Determinação da Percentagem do Ativo no Método Desenvolvido para o Inseticida <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> .....	53
6.1.5.	Validação do Método <i>Sinclair</i> e <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> .....	56
6.1.6.	Estudo da influência da quantidade de princípio ativo na determinação analítica .....	64
6.1.7.	Estudo da influência do <i>split</i> ratio nos resultados obtidos .....	66
6.2.	Desenvolvimento e Validação dos Inseticidas dos clientes <i>Aragon</i> e <i>Rentokil</i> .....	68
6.2.1.	Inseticida <i>Aragon I</i> .....	69
6.2.1.1.	Reagentes, Material e Equipamento.....	69
6.2.1.2.	Validação do Método <i>Aragon I</i> .....	73
6.2.2.	Desenvolvimento do Método <i>Aragon II</i> .....	76
6.2.2.1.	Validação do Método <i>Aragon II</i> .....	80
6.2.3.	Desenvolvimento Método <i>Rentokil I</i> .....	83
6.2.3.1.	Validação do Método .....	86
6.2.4.	Desenvolvimento Método <i>Rentokil II</i> .....	88
6.2.4.1.	Reagentes e Material .....	88
6.2.4.2.	Validação do Método .....	91
7.	Conclusão .....	95
8.	Bibliografia.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Atual logótipo da Empresa (Colep, 2013).....	3
Figura 1.2 - Mapa ilustrativo da localização das diferentes empresas do grupo COLEP (Colep, 2013).....	3
Figura 1.3 - Evolução do Volume de Negócios da COLEP no período de 2005 a 2012 (COLEP Portugal SA, 2012). ....	4
Figura 1.4 - Esquema ilustrativo da estrutura organizacional da COLEP Vale de Cambra (adaptado de Silva, 2011). ....	5
Figura 1.6 – Constituição detalhada de uma das linhas de enchimento (Pereira, 2008) .....	6
Figura 1.5 - Planta simplificada da área de enchimento onde se encontram as linhas de produção numeradas. ....	6
Figura 2.1 - Representação esquemática do funcionamento de um aerossol (Ferreira, 2010). ..	9
Figura 2.2 - Esquema ilustrativo da composição da válvula de um aerossol (esquerda) e dos seus elementos constituintes (direita), (1) Atuador; (2) capelo ou prato; (3) suporte de mola; (4) haste ou espiga; (5) mola; (6) corpo; (7) tubo pesca (AgrEvo Environmental Health, 1995).....	10
Figura 2.3 - Esquema de enchimento dos aerossóis (adaptado de Leite, 2013). ....	11
Figura 3.1 – Estrutura das piretrinas naturais ( Pérez-Fernández <i>et al</i> , 2010). ....	15
Figura 3.2 – Estrutura molecular da deltametrina e estrutura dos oito estereoisómeros (Johnson <i>et al</i> , 2010 e Environmental Health Criteria, 1997). ....	25
Figura 4.1 - Esquema de uma montagem típica de GC (Ferreira, 2010).....	30
Figura 4.2 - (1) – injeção em modo <i>split</i> (2) – injeção em modo <i>splitless</i> (adaptado de Agilent Technologies, 2002). ....	31
Figura 4.3 - Interior de um forno de GC. ....	31
Figura 4.4 - Ilustração do mecanismo de funcionamento de um detetor FID (Adaptado de Robert <i>et al</i> 2004). ....	32
Figura 5.1 – Esquema da preparação das soluções para a quantificação de princípios ativos em inseticidas. ....	35
Figura 5.2 – Esquema explicativo dos cromatogramas obtidos com a solução padrão e amostra. ....	36
Figura 6.1 – Sistema de alimentação dos gases (1); GC-FID (2); Computador como o software <i>ChemStation</i> (3); Unidade de ultrassons (4). ....	47
Figura 6.2 – Cromatograma da solução da deltametrina para o tempo de análise de 31 minutos. ....	49



Figura 6.3 – (1) Cromatograma obtido na análise da solução padrão do inseticida <i>Sinclair</i> ; (2) – Cromatograma obtido na análise da solução amostra do inseticida <i>Sinclair</i> . ....	50
Figura 6.4 – Cromatograma obtido na análise da solução amostra do inseticida <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> . ....	54
Figura 6.5 – Reta de calibração do princípio ativo.....	58
Figura 6.6 – Gráfico da distribuição observada e da distribuição teórica de Gauss para a percentagem de deltametrina calculada no desenvolvimento do método do inseticida <i>Sinclair</i> (esq.) – Gráfico do estudo comportamental dos resultados obtidos. (dir.).....	61
Figura 6.7 - Gráfico da distribuição observada e da distribuição teórica de Gauss para o percentagem de deltametrina calculada no desenvolvimento do método do inseticida <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> (esq.) – Gráfico do estudo comportamental dos resultados obtidos. (dir.)...	61
Figura 6.8 - Valores de percentagem de deltametrina calculados para uma solução amostra do inseticida <i>Sinclair</i> usando como referência soluções padrão preparadas com diferentes massas de deltametrina. ....	65
Figura 6.9 - Valores de percentagem de deltametrina calculadas para uma solução amostra do inseticida <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> usando como referência soluções padrão preparadas com diferentes massas de deltametrina. ....	66
Figura 6.10 – Razão das áreas em função da razão de <i>split</i> usada para a solução padrão e para a solução amostra.....	67
Figura 6.11 – Percentagem de deltametrina a solução amostra em função da razão de <i>split</i> para o inseticida do cliente <i>Sinclair</i> .....	68
Figura 6.12 – Cromatograma obtido na análise da solução padrão do inseticida <i>Aragon I</i> . ....	71
Figura 6.13 – Cromatograma obtido na análise da solução padrão do inseticida <i>Aragon II</i> . ....	78
Figura 6.14 – Cromatograma da análise da solução padrão do inseticida <i>Rentokil I</i> . ....	85
Figura 6.15 – Cromatograma da análise da solução padrão do inseticida <i>Rentokil II</i> .....	90

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Grupos substituintes das piretrinas ( Pérez-Fernández <i>et al</i> , 2010). ....	15
Tabela 3.2 - Estruturas dos piretróides (Pérez-Fernández <i>et al</i> , 2010).....	16
Tabela 3.3 - Atividade relativa de alguns piretróides para dois tipos diferentes de insetos (Rodobiko, 1994).....	23
Tabela 3.4 – Algumas propriedades da deltametrina. ....	26
Tabela 3.5 – Algumas propriedades do butóxido de piperonilo, neopinamina, permetrina, cipermetrina e bendiocarbe.....	27
Tabela 4.1 - Compostos com baixa ou nenhuma resposta no detetor FID (Adaptado de Robert <i>et al</i> 2004).....	33
Tabela 6.1 - Lista de reagentes utilizados no método do inseticida <i>Sinclair</i> e no método do inseticida <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> , fornecedor, risco e medida de controlo associados. ....	46
Tabela 6.2 - Condições de temperatura dos componentes do GC-FID. ....	48
Tabela 6.3 – Algumas condições operatórias utilizadas no GC-FID durante a análise das soluções. ....	48
Tabela 6.4 - Condições de temperatura dos componentes do GC-FID. ....	49
Tabela 6.5 - Algumas condições operatórias utilizadas no GC-FID durante a análise das soluções. ....	49
Tabela 6.6 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra, e respectivas áreas dos picos da deltametrina e padrão interno nos 10 ensaios efetuados.....	51
Tabela 6.7 - Condições de temperatura dos componentes do GC-FID. ....	52
Tabela 6.8 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra, e respectivas áreas dos picos da deltametrina e padrão interno nos 10 ensaios efetuados.....	52
Tabela 6.9 – Resultados obtidos da percentagem de deltametrina nos 10 ensaios realizados, média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ) no método desenvolvido para o inseticida do cliente <i>Sinclair</i> .....	53
Tabela 6.10 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra, e respectivas áreas dos picos da deltametrina e padrão interno nos 10 ensaios efetuados.....	55
Tabela 6.11 – Resultados obtidos da percentagem de deltametrina nos 10 ensaios realizados, média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ) no método desenvolvido para o inseticida do cliente <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> . ....	55
Tabela 6.12 – Massas usadas na preparação das soluções padrão, e respectivas áreas dos picos da deltametrina e padrão interno obtidos da sua análise cromatográfica, e respetiva razão das áreas. ....	56

Tabela 6.13 – Valores obtidos no cálculo das variâncias, <b>PG</b> e <b>F<sub>tab</sub></b> para as soluções padrão menos concentrada e mais concentrada.....	57
Tabela 6.14 – Concentração (média) de deltametrina nas soluções padrão preparadas, média das áreas da deltametrina e do padrão interno e correspondente razão das áreas média.....	58
Tabela 6.15 – Valores obtidos do desvio padrão da função linear ( <b>S<sub>x/y</sub></b> ), do desvio padrão da função não linear ( <b>S<sub>y2</sub></b> ), da diferença de variâncias ( <b>DS<sub>2</sub></b> ), de <b>PG</b> e valor de <b>F</b> tabelado para a determinação da linearidade da função calibração. ....	59
Tabela 6.16 – Limite de deteção ( <b>L.D</b> ) e limite de quantificação ( <b>L.Q</b> ) do método de análise dos inseticidas <i>Sinclair</i> e <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> . ....	59
Tabela 6.17 – Valores de <b>D<sub>exp</sub></b> e de <b>D<sub>tab</sub></b> para os métodos do inseticida <i>Sinclair</i> e inseticida <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> para aplicação ao teste de Kolmogorov-Smirnov.....	60
Tabela 6.18 – Variância, desvio padrão médio e coeficiente de variância da fração de deltametrina na solução amostra, calculados para os ensaios realizados durante o desenvolvimento do método <i>Sinclair</i> e do método <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> . ....	62
Tabela 6.19 – Gama de valores para a percentagem de deltametrina fornecida pelos clientes, valor considerado verdadeiro, média obtida dos valores experimentais ( <b>x</b> ) e erro relativo ( <b>Er</b> ) para os inseticidas dos clientes <i>Sinclair</i> e <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> .....	63
Tabela 6.20 – Valores obtidos para o <b>t<sub>cal</sub></b> e <b>t</b> das tabelas de distribuição de <i>Student</i> para um grau de significância de 0,5 % para os resultados obtidos no desenvolvimento dos métodos para o inseticida <i>Sinclair</i> e inseticida <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> . ....	64
Tabela 6.21 – Valores obtidos para o desempenho ( <b>Z</b> ) e <b>exatidão</b> dos resultados obtidos durante o desenvolvimento dos métodos para o inseticida <i>Sinclair</i> e inseticida <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> . ....	64
Tabela 6.22 – Valores de percentagem de deltametrina obtidos na solução amostra para diferentes massas de deltametrina na solução padrão e a respetiva média, para o inseticida <i>Sinclair</i> e para o inseticida <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i> .....	65
Tabela 6.23 – Área dos picos da deltametrina e do padrão interno para cada razão de <i>split</i> e correspondente razão das áreas e percentagem de deltametrina calculada. ....	67
Tabela 6.24 - Lista de reagentes utilizados no desenvolvimento do método <i>Aragon I</i> , percentagem de pureza, risco e medidas de controlo associados. ....	69
Tabela 6.25 – Caudais de hélio, hidrogénio e ar reconstituído utilizados no GC-FID durante a análise das soluções. ....	70
Tabela 6.26 - Condições de temperatura dos componentes do GC-FID. ....	71

Tabela 6.27 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra nos 7 ensaios efetuados.....	71
Tabela 6.28 – Áreas obtidas para os princípios ativos e padrão interno na solução padrão e solução amostra para o inseticida <i>Aragon I</i> nas 7 soluções padrão e amostra analisadas.....	72
Tabela 6.29 – Percentagem de cada princípio ativo no inseticida <i>Aragon I</i> nos 7 ensaios efetuados e respetiva média, desvio padrão e especificação do cliente.....	73
Tabela 6.30 - Valores de <b>Dexp</b> e de <b>Dtab</b> para cada princípio ativo do método do inseticida <i>Aragon I</i> .....	74
Tabela 6.31 – Variância, desvio padrão médio e coeficiente de variância calculados para os ensaios realizados cada princípio ativo durante o desenvolvimento do método do inseticida <i>Aragon I</i> .....	74
Tabela 6.32 - Gama de valores para a percentagem de cada princípio ativo fornecida pelo cliente, valor considerado verdadeiro, média obtida dos valores experimentais ( $\bar{x}$ ) e erro relativo ( $Er$ ) para cada princípio ativo do inseticida <i>Aragon I</i> .....	75
Tabela 6.33 - Valores obtidos para o $t_{cal}$ e $t$ das tabelas de distribuição de <i>Student</i> para 0,5 % de significância para os resultados obtidos no desenvolvimento do método do inseticida <i>Aragon I</i> para cada um dos seus princípios ativos.....	75
Tabela 6.34 - Valores obtidos para a incerteza do valor verdadeiro ( <b>I</b> ), desempenho ( <b>Z</b> ) e <b>exatidão</b> dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do método do inseticida <i>Aragon I</i> para cada um dos princípios ativos. ....	76
Tabela 6.35 - Percentagem de pureza, risco e medida de controlo para o princípio ativo bendiocarbe.....	76
Tabela 6.36 – Caudais de hélio, hidrogénio e ar reconstituído no GC-FID durante a análise das soluções. ....	77
Tabela 6.37 – Condições de temperatura dos componentes do GC-FID.....	77
Tabela 6.38 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra nos 10 ensaios efetuados para o inseticida <i>Aragon II</i> .....	78
Tabela 6.39 - Áreas obtidas para os princípios ativos e padrão interno na solução padrão para o inseticida <i>Aragon II</i> nas 10 soluções padrão analisadas.....	79
Tabela 6.40 - Áreas obtidas para os princípios ativos e padrão interno na solução amostra para o inseticida <i>Aragon II</i> nas 10 soluções amostra analisadas. ....	79
Tabela 6.41 - Percentagem de cada ativo no inseticida <i>Aragon II</i> nos 10 ensaios efetuados e respetiva média, desvio padrão e especificação do cliente.....	80

Tabela 6.42 - Valores de <b>Dexp</b> e de <b>Dtab</b> para cada princípio ativo do método do inseticida <i>Aragon II</i> . ....	81
Tabela 6.43 - Variância, desvio padrão médio e coeficiente de variância calculados para os ensaios realizados cada princípio ativo durante o desenvolvimento do método do inseticida <i>Aragon II</i> . ....	81
Tabela 6.44 - Gama de valores para a percentagem de cada princípio ativo fornecida pelo cliente, valor considerado verdadeiro, média obtida dos valores experimentais ( $\bar{x}$ ) e erro relativo ( $Er$ ) para cada princípio ativo do inseticida <i>Aragon II</i> . ....	82
Tabela 6.45 - Valores obtidos para o <b>tcal</b> e <b>t</b> das tabelas de distribuição de <i>Student</i> para 0,5 % de significância para os resultados obtidos no desenvolvimento do método do inseticida <i>Aragon II</i> para cada um dos seus princípios ativos. ....	83
Tabela 6.46 - Valores obtidos para o desempenho ( <b>Z</b> ) e <b>exatidão</b> dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do método do inseticida <i>Aragon II</i> para cada um dos princípios ativos.....	83
Tabela 6.47 - Caudais de hélio, hidrogénio e ar reconstituído utilizados no GC-FID durante a análise das soluções. ....	84
Tabela 6.48 – Condições de temperatura dos componentes do GC-FID.....	84
Tabela 6.49 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra, e respetivas áreas dos picos da permetrina e padrão interno nos 10 ensaios realizados.....	85
Tabela 6.50 – Percentagem da permetrina no inseticida <i>Rentokil I</i> nos 10 ensaios efetuados e respetiva média e desvio padrão. ....	86
Tabela 6.51 - Valores de <b>Dexp</b> e <b>Dtab</b> obtidos para a permetrina no método desenvolvido para o inseticida <i>Rentokil I</i> . ....	86
Tabela 6.52 – Variância, desvio padrão médio e coeficiente de variância calculados para os ensaios realizados durante o desenvolvimento do método do inseticida <i>Rentokil I</i> .....	87
Tabela 6.53 - Gama de valores para a percentagem da permetrina fornecida pelo cliente, valor considerado verdadeiro, média obtida dos valores experimentais ( $\bar{x}$ ) e erro relativo ( $Er$ ) para o inseticida <i>Rentokil I</i> . ....	87
Tabela 6.54 - Valores obtidos para o <b>tcal</b> e <b>t</b> das tabelas de distribuição de <i>Student</i> para o inseticida <i>Rentokil I</i> para os resultados obtidos no desenvolvimento do método. ....	87
Tabela 6.55 - Valor obtido para o desempenho ( <b>Z</b> ) e <b>Exatidão</b> dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do método para o inseticida <i>Rentokil I</i> .....	88
Tabela 6.56 –Reagentes utilizados na preparação das soluções.....	88

Tabela 6.57 – Caudais de hélio hidrogénio e ar reconstituído utilizados no GC-FID durante a análise das soluções. ....	89
Tabela 6.58 – Condições de temperatura dos componentes do GC-FID.....	89
Tabela 6.59 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra, e respetivas áreas dos picos da deltametrina e padrão interno nos 10 ensaios realizados.....	90
Tabela 6.60 - Percentagem da deltametrina no inseticida <i>Rentokil II</i> nos 10 ensaios efetuados e respetiva média e desvio padrão. ....	91
Tabela 6.61 - Valores de <b>Dexp</b> e de <b>Dtab</b> para cada princípio ativo do método do inseticida <i>Rentokil II</i> . ....	91
Tabela 6.62 – Variância, desvio padrão médio e coeficiente de variância calculados para os ensaios realizados durante o desenvolvimento do método do inseticida <i>Rentokil II</i> .....	92
Tabela 6.63 - Gama de valores de percentagem da deltametrina fornecida pelo cliente, valor considerado verdadeiro, média obtida dos valores experimentais ( <b>x</b> ) e erro relativo ( <b>Er</b> ) para o inseticida <i>Rentokil II</i> . ....	92
Tabela 6.64 - Valores obtidos para o <b>tcal</b> e <b>t</b> das tabelas de distribuição de <i>Student</i> para o inseticida <i>Rentokil II</i> para os resultados obtidos no desenvolvimento do método. ....	92
Tabela 6.65 - Valor obtido para o desempenho ( <b>Z</b> ) e <b>Exatidão</b> dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do método para o inseticida <i>Rentokil II</i> .....	93



## ABREVIATURAS

**A<sub>1</sub>**- Linha de enchimento de produtos cosméticos de base aquosa em embalagens metálicas da empresa COLEP Vale de Cambra.

**A<sub>2</sub>**- Linha de enchimento de produtos cosméticos em embalagens metálicas da empresa COLEP Vale de Cambra.

**A<sub>3</sub>**- Linha de enchimento de produtos cosméticos de base aquosa em embalagens metálicas da empresa COLEP Vale de Cambra.

**A<sub>4</sub>**- Linha de enchimento de produtos cosméticos em embalagens metálicas da empresa COLEP Vale de Cambra.

**A<sub>5</sub>**- Linha de enchimento de produtos cosméticos em embalagens metálicas da empresa COLEP Vale de Cambra.

**A<sub>6</sub>**- Linha de enchimento de produtos não cosméticos em embalagens metálicas da empresa COLEP Vale de Cambra.

**BEN** - Bendiocarbe.

**CIP** - Cipermetrina.

**CV** - Coeficiente de variância.

**DEL** – Deltametrina.

**DDT** - Dicloro-difenil-tricloroetano

**ECD** - Cromatografia gasosa de captura de eletrões.

**ER** - Erro relativo.

**FR** - Fator de Resposta.

**GABA** - Ácido gama amino butírico.

**GC-FID** - Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama.

**GC-MS** - Cromatografia gasosa com detetor de espetrometria de massa.

**GC-NPD** - Cromatografia gasosa com detetor de fosforo-azoto.

**GPC** - Cromatografia líquida de permeação de gel.

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência.

**IEC** - Cromatografia líquida de permuta iónica.

**ISTD** - Padrão Interno.

**L. D.** - Limite de deteção.

**L. Q.** - Limite de quantificação.

**L<sub>1</sub>**- Linha de enchimento de produtos líquidos não cosméticos em embalagens plásticas da empresa COLEP Vale de Cambra.



**L<sub>2</sub>**- Linha de enchimento de produtos líquidos não cosméticos em embalagens metálicas da empresa COLEP Vale de Cambra.

**NEO** - Neopinamina.

**PBO** - Butóxido de piperonilo.

**PER** - Permetrina.

**SEC** - Cromatografia líquida de exclusão molecular.

**SPSS** - *Statistical Program Standard Software*

**[DEL** - Concentração de deltameterina.

## SIMBOLOGIA

**A(ativo)<sub>amostra</sub>** - Área do pico de princípio ativo na solução amostra.

**A(ativo)<sub>padrão</sub>** - Área do pico de princípio ativo na solução padrão.

**A(ISTD)<sub>amostra</sub>** - Área do pico do padrão interno na solução amostra.

**A(ISTD)<sub>padrão</sub>** - Área do pico do padrão interno na solução padrão.

**C(ativo)<sub>amostra</sub>** - Concentração de princípio ativo na solução amostra.

**C(ativo)<sub>padrão</sub>** - Concentração de princípio ativo na solução padrão.

**C(ISTD)<sub>amostra</sub>** - Concentração de padrão interno na solução amostra.

**C(ISTD)<sub>padrão</sub>** - Concentração de padrão interno na solução padrão.

**b** - Declive de uma reta do tipo  $a = y - bx$ .

**D<sub>exp</sub>** - Valor experimental para a aplicação do teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

**D<sub>tab</sub>** - Valor tabelado do teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

**DS<sup>2</sup>** - Diferença de variâncias.

**F** - Distribuição de Snedecor/Fisher.

**fd, padrão**- Factor de diluição do ativo.

**fd, amostra**- Fator de diluição do padrão interno.

**f(x)** - Função de distribuição de Gauss.

**FR(ativo)<sub>padrão</sub>** - Fator de resposta do analito.

**FR(ISTD)<sub>padrão</sub>** - Fator de resposta do padrão interno.

**I** - Incerteza.

**m(inseticida)<sub>amostra</sub>** - Massa de inseticida na solução amostra.

**m(ativo)<sub>amostra</sub>** - Massa de princípio ativo na solução amostra.

$m(\text{ativo})_{\text{padrão}}$  - Massa de princípio ativo na solução padrão.

$m(\text{ISTD})_{\text{amostra}}$  - Massa de padrão interno na solução amostra.

$m(\text{ISTD})_{\text{padrão}}$  - Massa de padrão interno na solução padrão.

$n$  - Número de ensaios efetuados.

$N$  - Número de padrões de calibração.

$RRF$  - Fator de resposta relativo.

$S^2$  - Variância.

$S_{y/x}$  - Desvio padrão da função calibração linear.

$S_{y^2}$  - Desvio padrão da função calibração não-linear.

$t$  - Valor da distribuição de *Student*.

$t_{\text{cal}}$  - Valor de  $t$  calculado através dos resultados experimentais.

$V(\text{ativo})_{\text{amostra}}$  - Volume total (do balão volumétrico) da solução amostra.

$V(\text{ativo})_{\text{padrão}}$  - Volume total (do balão volumétrico) da solução padrão.

$V_{\text{amostra}}$  - Volume total (do balão volumétrico) da solução de padrão interno efetuada para a formulação da solução amostra.

$V_{\text{padrão}}$  - Volume total (do balão volumétrico) da solução de padrão interno efetuada para a formulação da solução padrão.

$\bar{x}$  - Média aritmética dos valores obtidos experimentalmente para a percentagem de princípio ativo.

$x_0$  - Média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio.

$x_i$  - Valor de percentagem de princípio ativo de cada ensaio.

$x_v$  - Valor de percentagem de princípio ativo considerado verdadeiro.

$Z$  - Fator de desempenho.

$\sigma_0$  - Desvio padrão associado a  $x_0$ .

$\sigma$  - Desvio padrão associado a  $\bar{x}$ .

$\sigma_m$  - Desvio padrão médio.

.% **ativo** - Percentagem de princípio ativo no inseticida.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Objetivo

Este estágio teve como objetivo principal o desenvolvimento de um método de determinação do princípio ativo deltametrina que se encontra presente em inseticidas fornecidos por dois clientes distintos, o cliente *Sinclair* e o cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*, por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama. Com o decorrer do estágio mostrou-se necessário validar outros métodos experimentais de determinação de princípios ativos em inseticidas, para o cliente *Aragon* foram desenvolvidos dois métodos: um para a determinação conjunta do butóxido de piperonilo, permetrina, neopinamina e cipermetrina, num inseticida denominado *Aragon I*, e um segundo para a determinação conjunta de butóxido de piperonilo, permetrina, neopinamina, cipermetrina e bendiocarbe, designando-se *Aragon II*; para o cliente *Rentokil* foram também desenvolvidos dois métodos: um para a determinação da permetrina num inseticida denominado *Rentokil I* e o outro para a determinação da deltametrina num inseticida denominado *Rentokil II*.

O estágio teve também como objetivo proporcionar ao estagiário a integração e experiência de trabalhar em ambiente industrial, e assim ter contato com os métodos de trabalho e conhecimentos envolvidos no desenvolvimento e fabrico dos aerossóis fabricados na empresa.

A aquisição de conhecimentos relativos aos materiais e métodos de análises, assim como dos procedimentos de controlo de qualidade e a familiarização com a técnica analítica de cromatografia gasosa aplicada à análise de inseticidas e de produtos de gel, constituíram outros dos objetivos da realização deste estágio.

### 1.2. Organização do Relatório de Estágio

Este relatório está dividido em sete capítulos. No primeiro capítulo, faz-se a apresentação da empresa e descreve-se a área de enchimento onde foi realizado o estágio.

No capítulo 2, descreve-se o processo de enchimento de aerossóis, uma vez que a empresa onde o estágio foi realizado se dedica ao enchimento de todo o tipo de aerossóis, apresentando-se também neste capítulo uma breve descrição do funcionamento e das principais características dos aerossóis.

Os tipos de inseticidas e as suas características encontram-se descritos no capítulo 3, dando-se mais importância aos inseticidas piretróides, uma vez que a maioria dos princípios ativos estudados pertence a esta família de inseticidas. Neste capítulo, são também apresentadas as propriedades dos princípios ativos utilizados nos inseticidas estudados.

No capítulo 4 faz-se uma breve apresentação do método analítico utilizado para a determinação de princípios ativos em inseticidas, dando maior relevo à cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama, pois foi o método de análise utilizado durante o estágio.

No capítulo 5 apresenta-se a metodologia usada para o cálculo da percentagem dos princípios ativos presentes em cada inseticida, assim como dos parâmetros de validação dos métodos de análise desenvolvidos.

No capítulo 6, encontra-se a descrição do trabalho experimental efetuado durante a implementação de todos os métodos desenvolvidos, assim como dos resultados experimentais obtidos, dos cálculos efetuados e apresenta-se a sua discussão. Neste capítulo foi dada maior importância aos métodos desenvolvidos para os inseticidas dos cliente *Sinclair* e do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*, por terem sido os dois inseticidas que inicialmente tinham sido propostos para estudo durante o estágio.

No último capítulo encontram-se as principais conclusões dos trabalhos realizados durante o estágio.

### 1.3. Apresentação da Empresa

A COLEP, empresa produtora de embalagens para a indústria atua em quatro áreas de negócio: o *Metal Packaging*, que se dedica à produção de embalagens metálicas (aerossóis e latas de pintura, revestimento e alimentares); o *Plastic Packaging*, que atua ao nível das embalagens plásticas; o *Contract Operations*, que compreende a formulação, enchimento e embalamento de produtos na área de pesticidas, agroquímicos, perfumes, cosméticos, higiene pessoal, limpeza, polimento e proteção, e a *Speciality Custom Manufacturing*, que consiste na formulação e enchimento de produtos farmacêuticos não sujeitos a prescrição médica (Lucas, 2008, Gonçalves, 2012 e Agência Portuguesa do Ambiente, 2011).

Fundada no ano de 1965 por Ilídio Pinho, a COLEP inicia a sua internacionalização no ano de 1993, através da aquisição da fábrica *S.C.Johnson's*, em Espanha, constituindo a COLEP Espanha. Seguiu-se, em 1999, a compra da fábrica *Shirley & Associates* no Reino Unido, que se dedica ao *Contract Operations*. Ainda no mesmo ano, a COLEP adquiriu a fábrica da *Comercial Envases* de Navarra em Espanha, que passou a denominar-se COLEP Navarra, dedicada à produção de embalagens em folha-de-flandres. No ano de 2001, foi feito na Polónia o primeiro investimento de raiz no estrangeiro, através de uma fábrica de *Contract Manufacturing*, designada por COLEP *Polska*. Também no ano de 2001, o grupo RAR adquire através de uma oferta pública o capital da COLEP na sua totalidade (Lucas, 2008; Sagape, 2009; Almeida, 2010; Pereira, 2008 e Ferreira, 2010).

Em 2004, a COLEP fundiu-se às divisões europeias de *Custom Manufacturing* da CCL Industries Inc., formando a COLEPCCL, que se encontra detida a 60% pelo grupo RAR (Holding) e 40% pela CCL. Esta fusão tornou a COLEPCCL na maior empresa europeia de *Contract Manufacturing* de produtos de cosmética, higiene pessoal, cuidado do lar e farmacêutica não sujeitos a prescrição médica, em regime de *outsourcing* de empresas multinacionais (Sagape, 2009 e Almeida, 2010).

Para dar continuidade à sua política expansionista, no ano de 2009 a COLEPCCL funde-se com a empresa alemã CZEWO, congénere da COLEPCCL. Em 2010 deu o primeiro passo na sua expansão fora da Europa, formando a CPA com a brasileira Provider, que ocupa um

lugar de destaque no mercado latino-americano de *Contract Manufacturing* de produtos de higiene pessoal e cuidado do lar. A CPA opera a partir de uma nova unidade industrial para enchimento de aerossóis, em São Paulo, com capacidade para a produção de 150 milhões de unidades por ano. A COLEPCCL controla a operação, detendo 51% da CPA (Ferreira, 2010 e Jornal de Negócios, 2010).

No dia 1 de Julho de 2011 a COLEPCCL muda de denominação para COLEP, renovando a imagem da empresa que se apresenta na Figura 1.1.



Figura 1.1 – Atual logótipo da Empresa (Colep, 2013).

Já no ano de 2013, no mês de Setembro a COLEP estabelece uma parceria com a One Asia, empresa que é constituída por 3 fábricas de produção de bens de consumo que lidera o mercado asiático na área de produção de aerossóis e de componentes líquidos. A One Asia é constituída pela Daizo Corporation Japan, Pax Australia e Asian Aerosol OAN of India.

Em Outubro de 2013 a COLEP anuncia a aquisição de uma fábrica no México, a *Aerosoles y Líquidos S.A de C.V.*, em Santiago de Querétaro. No mês de Novembro do mesmo ano a COLEP expande-se para o mercado do médio oriente com a junção à *Scitra*, empresa nos Emirados Árabes Unidos (Colep, 2013).

Na Figura 1.2 apresenta-se a distribuição das fábricas da COLEP no mundo no ano de 2013.

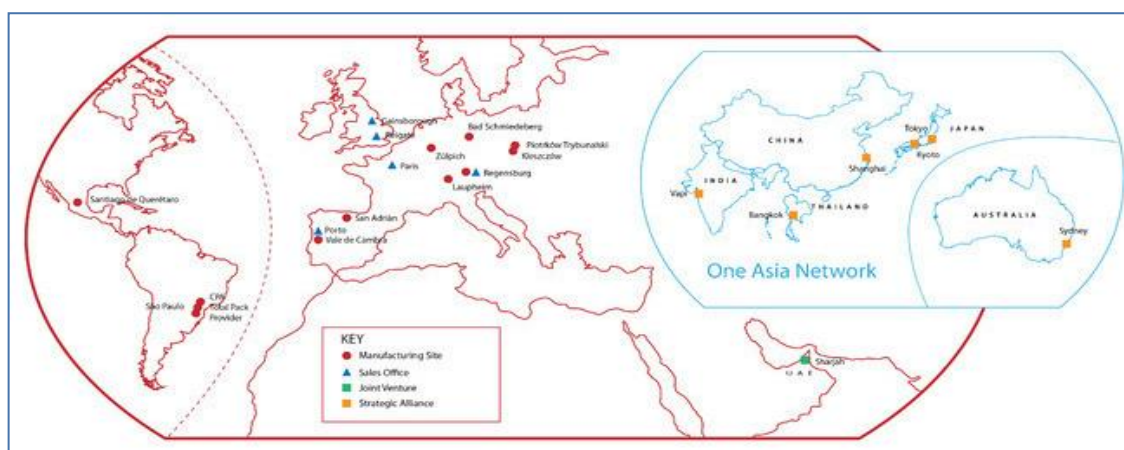


Figura 1.2 - Mapa ilustrativo da localização das diferentes empresas do grupo COLEP (Colep, 2013).

### 1.3.1. Missão, Visão e Valores da Empresa

A missão assumida pela COLEP consiste na colaboração com os seus clientes de forma a proporcionar conforto e bem-estar aos consumidores.

A visão da COLEP é ser o líder na criação de valor, promovendo a reestruturação das indústrias de *Contract Manufacturing* e Embalagens, através do estabelecimento de relações de longo prazo com os clientes, integração e oferta de um serviço de qualidade superior.

No que diz respeito aos valores da COLEP, podem-se distinguir os seguintes:

- Focalização no cliente: “Alcançar e exceder as expectativas dos nossos clientes”;
- Responsabilidade ética e moral: “Desenvolver os negócios de uma maneira ética e socialmente responsável”;
- Promover a aprendizagem: “Perseguir a excelência através da melhoria contínua, fomentando a divulgação do conhecimento numa organização em continua aprendizagem e desenvolvimento”;
- Abertura, confiança e sentido de justiça: “Respeitar os nossos colegas dentro e fora da organização com permanente abertura, confiança e sentido de justiça”;
- Criatividade: “Através de novas ideias e iniciativas criaremos um ambiente que propicie o trabalho em equipa, agradável e divertido”;
- Criação de valor: “Comprometidos com os nossos valores, criaremos valor para a nossa Empresa”.

A empresa procura que todos os colaboradores corroborem estes princípios uma vez que a cultura empresarial é a parte integrante do esforço da COLEP no desenvolvimento das capacidades necessárias para alcançar a visão proposta (Colep, 2013).

### 1.3.2. Volume de Negócios da COLEP

Com um volume de negócios de 543 M€ no ano de 2012 e com mais de 3616 colaboradores, a COLEP é uma empresa que tem vindo a crescer sustentadamente ao longo dos anos, tendo-se tornado na empresa europeia com maior volume de *Contract Manufacturing*. O desenvolvimento de importantes atividades na área das embalagens metálicas e de plástico, permite à COLEP dispor de condições que permitem acompanhar os seus clientes na crescente tendência de soluções de subcontratação.

Na Figura 1.3 apresentam-se os valores do volume de negócios gerado pela COLEP nos últimos 8 anos (Almeida, 2010 e Colep, 2013).

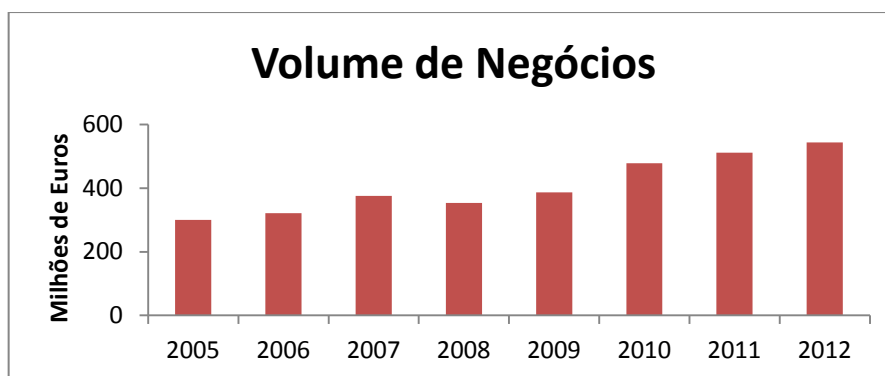


Figura 1.3 - Evolução do Volume de Negócios da COLEP no período de 2005 a 2012 (COLEP Portugal SA, 2012).

Pela análise do gráfico anterior pode-se verificar que a COLEP aumentou o seu volume de negócios, com exceção no ano de 2008, em que ocorreu um ligeiro decréscimo, facilmente ultrapassado nos anos seguintes. Verifica-se que em comparação com os valores de 2005, 2012, obteve um valor superior em mais de 200 milhões de euros, levando assim a crer que a tendência de crescimento desta empresa é sustentável.

### 1.3.3. Empresa COLEP de Vale de Cambra

A empresa do grupo COLEP localizada em Vale de Cambra é composta por 3 divisões:

O *Contract Operations*, o *Packaging* e o *Specialty Custom Manufacturing*, sendo que o *Packaging* que é composto por 4 secções: *i) Embalagens de Aerossol*, onde se fabricam as embalagens de três peças em folha-de-flandres, e se acomoda o aerossol com as especificações da FEA (Federação Europeia de Aerossóis); *ii) Embalagens Industriais/Alimentares*, onde se produzem embalagens de maiores dimensões, nomeadamente com capacidade de 30 litros como os baldes de tinta, e latas de azeite, azeitona, salsichas e bolachas; *iii) Litografia* onde se procede à impressão das embalagens em folha-de-flandres; *iv) Embalagens de Plásticos* onde se fabricam embalagens de plástico e os seus acessórios (tampas, por insuflação e por injeção), que são maioritariamente utilizados em produtos de limpeza (Ferreira, 2010 e Silva, 2011).

Na Figura 1.4 apresenta-se um esquema que ilustra a estrutura organizacional da fábrica COLEP em Vale de Cambra.

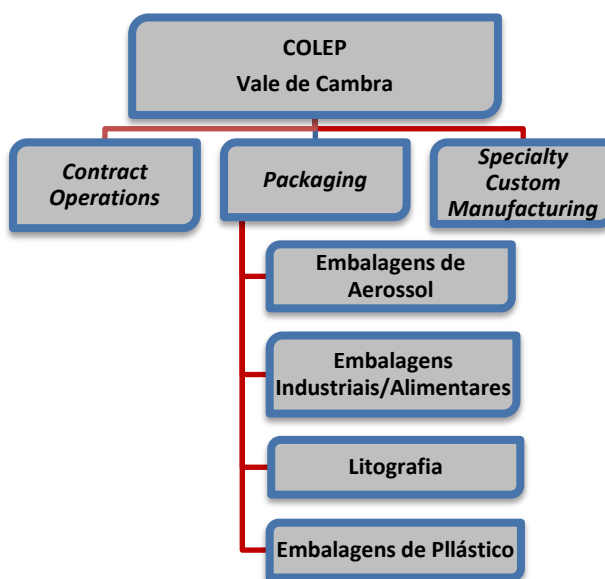


Figura 1.4 - Esquema ilustrativo da estrutura organizacional da COLEP Vale de Cambra (adaptado de Silva, 2011).

### 1.4. Secção de Enchimento da fábrica COLEP de Vale de Cambra

O estágio curricular do Mestrado em Processos Químicos e Biológicos foi realizado na secção do *Contract Operations*, onde são formulados os produtos a encher nas linhas de produção. Na Figura 1.5 encontra-se um esquema que representa a forma como se encontra organizada a secção de enchimento da empresa COLEP Vale de Cambra.



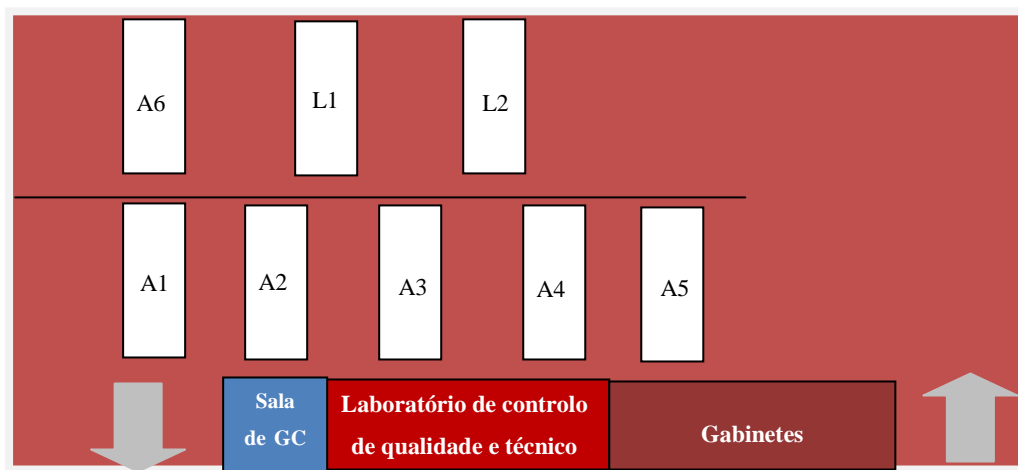


Figura 1.5 - Planta simplificada da área de enchimento onde se encontram as linhas de produção numeradas.

Pode-se observar na figura anterior a disposição das linhas de enchimento dos produtos produzidos pela COLEP, existe uma linha de enchimento de produtos líquidos em embalagens plásticas ( $L_1$ ), sendo as restantes linhas de enchimento de embalagens metálicas, as linhas  $A_1$  e  $A_3$  são linhas de enchimento para produtos de base aquosa. As 5 linhas da parte frontal ao laboratório ( $A_1$  a  $A_5$ ) enchem produtos cosméticos e as restantes três ( $A_6$ ,  $L_1$  e  $L_2$ ), enchem produtos não cosméticos. Verifica-se também que o laboratório de controlo de qualidade e técnico encontra-se localizado em frente das linhas de enchimento, com uma boa visão para todo o processo de produção. As setas a cinzento simbolizam o local por onde saem as paletes de produto embalado e por onde entram os produtos químicos necessários à formulação.

Na Figura 1.6 indicam-se os intervenientes habituais de uma linha de enchimento.

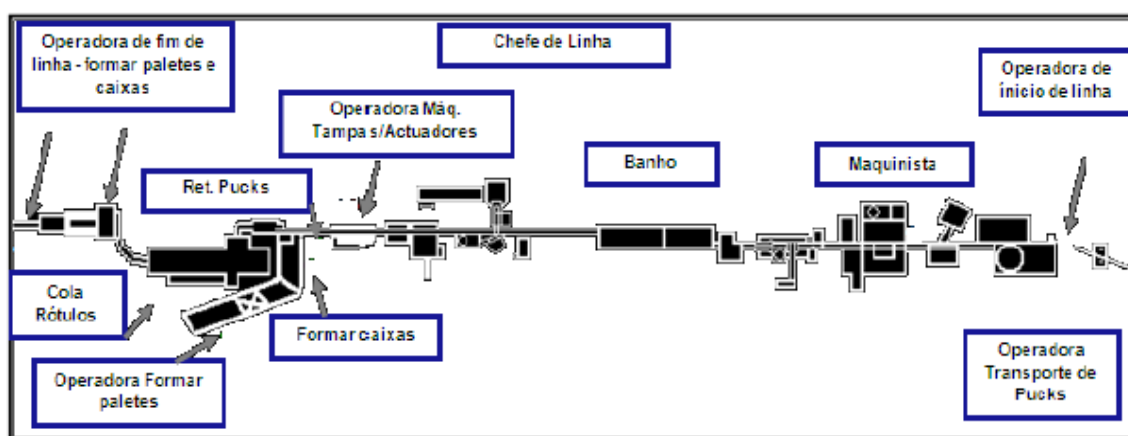


Figura 1.6 – Constituição detalhada de uma das linhas de enchimento (Pereira, 2008)

Através da análise da Figura 1.6, pode-se observar que, em média são necessários 11 operadores por linha, sendo que o maquinista não é específico para cada uma das linhas, operando em várias simultaneamente.

No laboratório, local onde foi desenvolvido o presente trabalho, colaboram vários operadores: dois elementos que realizam o controlo de qualidade em turnos; um que procede ao controlo das linhas a nível microbiológico; um que é responsável pelas auditorias; dois elementos que são responsáveis pela organização das linhas que trabalham por turnos e, ainda, mais dois elementos que se responsabilizam pela parte técnica. Os elementos que realizam o controlo de qualidade, fazem análises a todos os produtos que saem das linhas de enchimento, às matérias-primas que chegam à empresa e, ainda, realizam o controlo das linhas, como por exemplo, das balanças e dos banhos. Os colaboradores da parte técnica estão responsáveis, entre outras tarefas, pela recolha e envio de amostras aos clientes e pela, realização de testes de controlo de aerossóis em fase de desenvolvimento.



## 2. AEROSSÓIS

Um aerossol é uma suspensão coloidal na qual um sólido, ou líquido, se encontra disperso numa fase gasosa. Quando a fase dispersa é sólida designa-se de fumo, e quando é um líquido designa-se de névoa (Hinds, 1999 e Ferreira, 2010).

A primeira lata de aerossol com válvula foi desenvolvida por um engenheiro norueguês, Erik Rotheim, em 1929, sendo que os elementos básicos da sua patente estão ainda presentes nos aerossóis atuais (Leite, 2013).

O aerossol é basicamente constituído por um concentrado, propulsor, recipiente e válvula.

O princípio de ação de um aerossol encontra-se esquematizado na Figura 2.1. O conceito baseia-se no seguinte, quando se aperta o atuador da lata de aerossol, o gás (o propulsor) que se encontra no interior da lata de aerossol comprimido, expande-se, forçando, assim, o líquido que está dentro da lata a sair. O atuador, além da função de libertar o líquido do interior da lata, tem também a função de dispersar o líquido em pequenas gotículas, formando desta forma o *spray* (Leite, 2013 e Ferreira 2010).

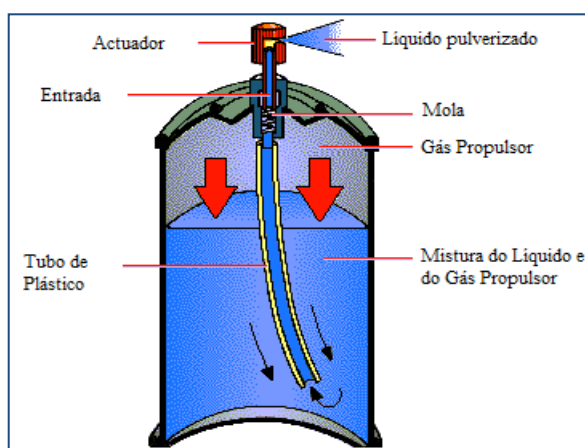


Figura 2.1 - Representação esquemática do funcionamento de um aerossol (Ferreira, 2010).

O propulsor é o gás que se encontra acima do conteúdo líquido no interior da lata de aerossol e vai empurrar o líquido forçando-o a subir através do tubo imerso e a sair para o exterior da lata (Ferreira, 2010).

Os recipientes de aerossóis podem ser de alumínio, plástico ou vidro, mas o mais utilizado em aerossóis de inseticidas são os fabricados a partir de folha-de-flandres. A lata de folha-de-flandres é formada por 3 peças: um corpo cilíndrico, a base do cilindro e os componentes da válvula, os quais estão unidos por uma costura dupla (AgrEvo Environmental Health, 1995)

É essencial que a lata de aerossol consiga manter as suas características a temperaturas até 50°C.

A válvula de um aerossol é constituída pelo tubo pesca, corpo, mola, haste ou espiga, suporte da mola, capelo ou prato e o botão com “insert” (AgrEvo Environmental Health, 1995) e a sua função é essencial: pois mantém o recipiente hermético, limpo e higiênico e

regula o fluxo do produto durante a utilização (Leite, 2013) Na Figura 2.2 apresenta-se o esquema que ilustra a composição da válvula de um aerossol.



**Figura 2.2 - Esquema ilustrativo da composição da válvula de um aerossol (esquerda) e dos seus elementos constituintes (direita), (1) Atuador; (2) capelo ou prato; (3) suporte de mola; (4) haste ou espiga; (5) mola; (6) corpo; (7) tubo pesca (AgrEvo Environmental Health, 1995).**

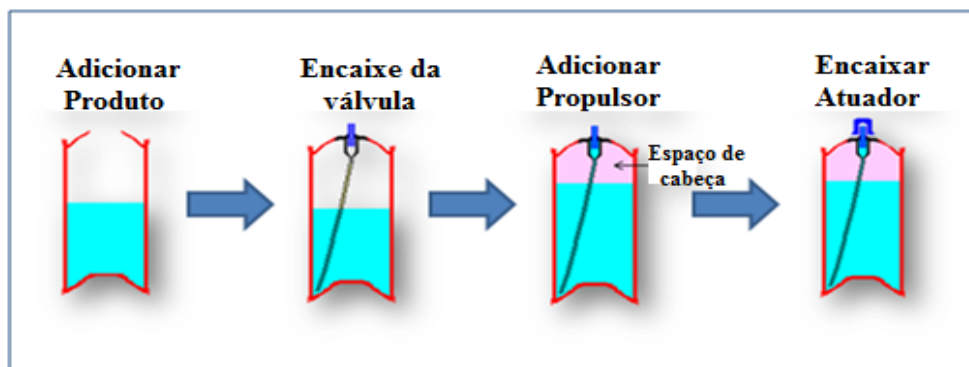
## **2.1. Processo de Enchimento de aerossóis**

O enchimento do aerossol começa pela introdução do produto, normalmente em forma de líquido, no interior da lata, que contém todos os ingredientes ativos constituintes da sua fórmula. O volume do líquido adicionado tem que ser controlado para se garantir que está em conformidade com a legislação em vigor, nomeadamente com o Decreto-Lei n.º 61/2010 de 3 de Maio (Leite, 2013 e Diário da República, 2010).

A fase seguinte é a cravação da válvula. Esta etapa é de enorme exigência, sendo necessário haver uma boa manutenção e ajuste das máquinas de cravação e do controlo das dimensões de cravação para, deste modo, garantir uma boa selagem.

De seguida é injetado sob pressão o propulsor através da válvula. No final desta etapa o aerossol está pressurizado, sendo, então, as latas imersas num banho a 50 °C, para ser possível a deteção de fugas, e, nesse caso, serem rejeitadas.

Os atuadores são normalmente colocados na etapa seguinte, embora haja alguns atuadores que já vêm montados na válvula. Na Figura 2.3 encontra-se o esquema das etapas referidas para o enchimento de aerossóis.



**Figura 2.3 - Esquema de enchimento dos aerossóis (adaptado de Leite, 2013).**

Na fase final, coloca-se a tampa do aerossol, que, por regra, contém sistemas de segurança invioláveis (Leite,2013).

Finalmente os aerossóis são rotulados, com a identificação do lote, e são colocados em caixas ou tabuleiros e dispostos em paletes.



### 3. INSETICIDAS

Os inseticidas são um subgrupo de produtos utilizados na eliminação de pragas, entendidas como todos os animais, plantas ou microrganismos que vivem onde não são desejados, denominados pesticidas, e cuja aplicação visa prevenir, destruir, repelir ou anular a capacidade de uma praga competir com outros organismos (Gilbert, 2012 e Santos, 2001).

Os pesticidas podem ser de natureza química ou biológica e visam atuar sobre as pragas que estão a causar danos, quer a nível da saúde humana, quer de plantações. Os pesticidas mais utilizados são os inseticidas que atuam ao nível dos insetos e os herbicidas que atuam ao nível das plantas (Vilarinho, 2011 e Fernandes, 2010).

O primeiro pesticida utilizado, foi um inseticida, quando por volta do ano 1000 AC os povos da China, da Grécia e da Suméria se aperceberam da capacidade do pó de enxofre para controlar populações de insetos (Gilbert, 2012 e Vilarinho, 2011).

No ano de 1814, começou a ser comercializado o primeiro inseticida sintético de utilização generalizada, o verde de Paris (acetoarsenito de cobre) que, em 1867, foi utilizado para combater o escaravelho da batata. Devido ao seu uso descontrolado, os Estados Unidos da América, estabeleceram a primeira legislação sobre o uso de inseticidas, sendo alguns anos mais tarde proibida a comercialização deste inseticida devido à extrema toxicidade que apresenta sobre os mamíferos (Vilarinho, 2011).

A partir de 1930 e início dos anos 40, uma enorme variedade de inseticidas foi desenvolvida, entre eles o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), que foi sintetizado pelo alemão Othmar Zeidler, para ser utilizado como potencial agente da guerra química. Em 1948, o químico suíço Paul Hermann Muller recebeu o prémio nobel da medicina, por ter descoberto a eficácia do DDT na erradicação do tifo e da malária, tendo este inseticida sido largamente usado após a Segunda Guerra Mundial para o combate dos mosquitos vetores daquelas doenças (Gilbert, 2012 e Vilarinho, 2011). Atualmente o DDT está proibido em pelo menos 86 países, sendo utilizado ainda em alguns países no combate à malária.

Os inseticidas podem classificar-se em inseticidas sintéticos orgânicos, inorgânicos, botânicos e agentes biológicos.

#### 3.1. Inseticidas Sintéticos Orgânicos

Os inseticidas sintéticos orgânicos dividem-se em 3 grupos, os organoclorados, organofosfatados e carbamatos (Santos, 2001).

A estrutura química dos inseticidas organoclorados pode variar, mas todos eles têm em comum o facto de apresentarem na sua composição carbono, hidrogénio e cloro (Gilbert, 2012). São altamente hidrofóbicos e bastante estáveis devido ao facto de possuírem um átomo de cloro difícil de eliminar, tornando-os de degradação muito lenta, o que fez com que fossem banidos em alguns países. Os organoclorados podem, ainda, ser subdivididos em 3 grupos, entre os quais se encontra o DDT que pertence ao grupo dos inseticidas organoclorados difenilalifáticos, a dieldrina ( $C_{12}H_8Cl_6O$ ) pertence ao grupo dos inseticidas organoclorados



ciclodienos e o toxaphene pertence ao terceiro e último grupo dos inseticidas organoclorados, que é constituído pelos policloroterpenos (Santos, 2001 e Alves, 2005).

Os inseticidas organofosfatados contêm fósforo na sua estrutura química. São divididos em várias classes tais como: fosforados (derivados do ácido fosfórico ou do ácido pirofosfórico), tiofosforados (derivados do ácido tionofosfórico) e clorofosforados. Como são quimicamente instáveis, não são persistentes no ambiente o que levou à sua grande utilização na agricultura em substituição dos organoclorados (Santos, 2001).

Os carbamatos são compostos derivados do ácido carbâmico, mais propriamente do ácido n-metilcarbâmico, sendo muito versáteis uma vez que funcionam como inseticidas, herbicidas, fungicidas e anti-bacterianos. O modo de ação deste tipo de inseticidas é semelhante ao dos inseticidas organofosfatados, sendo no entanto mais rapidamente degradados o que se traduz numa baixa toxicidade para os mamíferos (Santos, 2001). Exemplos de compostos carbamatos são o bendiocarbe, utilizado neste estágio, o carbamil, o baygon, o moban e o zectran (Santos *et al*, 2007).

### 3.2. Inseticidas Inorgânicos

Os inseticidas inorgânicos foram os primeiros a ser utilizados pelo homem e deles fazem parte, o arsénio, o enxofre, o cobre, o mercúrio, o boro, o antimónio e o selénio, entre outros. O arsénio ainda hoje é utilizado como inseticida, sendo normalmente comercializado como arsenato de chumbo.

### 3.3. Inseticidas Botânicos

Os inseticidas botânicos são obtidos a partir de plantas que contêm químicos tóxicos para os insetos, podendo ser utilizados sozinhos ou em combinação com outros químicos. Apesar de serem obtidos de forma natural, podem ser extremamente nocivos, embora a sua rápida degradação quando expostos à luz, diminua o risco de permanência de resíduos nas colheitas. Os inseticidas botânicos mais importantes são os piretróides, que apareceram, nos inícios dos anos 80, como substitutos dos inseticidas organoclorados, uma vez que apresentavam baixa toxicidade aguda para os mamíferos, não se acumulavam nos tecidos adiposos e não eram persistentes no ambiente (Santos *et al*, 2007; Wenclawiak e Otterbach, 2008 e Santos, 2001).

Os piretróides, são inseticidas derivados das piretrinas que são ésteres dos ácidos crisantémico e pirétrico com os álcoois piretrolona, cinerolona e jasmolona (ciclopentenolonas) isolados a partir das flores de espécies como *Chrysanthemum cinerariaefolium* existente no Japão, África e América do Sul (Santos, 2001; Wenclawiak e Otterbach, 2008 e Rodobiko, 1994).

Na natureza existem 6 tipos de piretrinas, divididas em dois grupos; os ésteres derivados do ácido crisantémico (grupo I) e os ésteres derivados do ácido piretrolona (grupo II), na Figura 6.1 encontra-se a estrutura química das piretrinas naturais, e, na Tabela 3.1 os seus grupos substituintes (Abad, 2006).

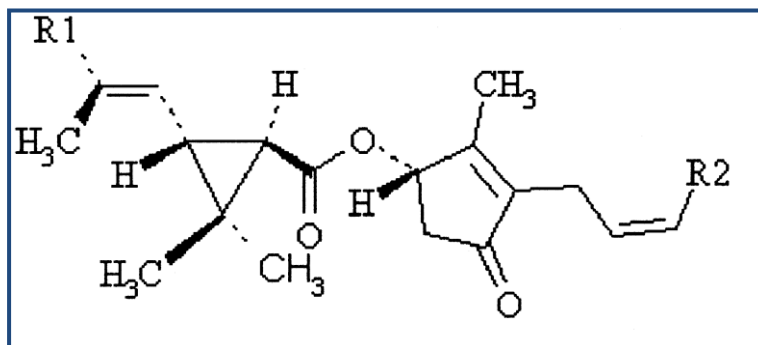


Figura 3.1 – Estrutura das piretrinas naturais ( Pérez-Fernandez *et al*, 2010).

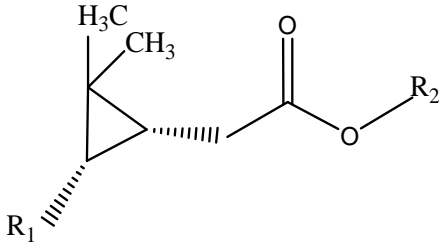
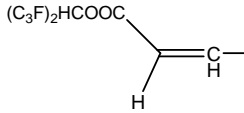
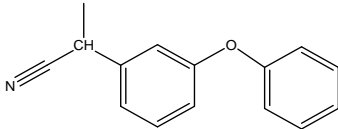
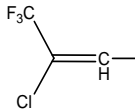
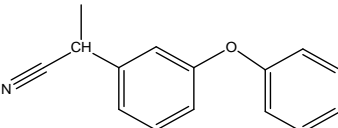
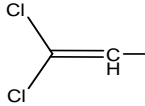
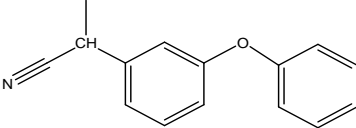
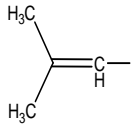
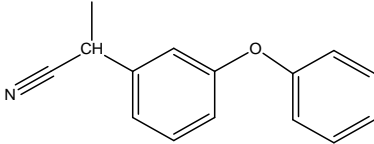
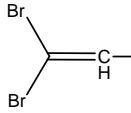
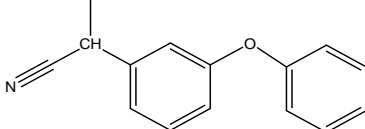
Tabela 3.1 - Grupos substituintes das piretrinas ( Pérez-Fernandez *et al*, 2010).

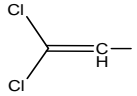
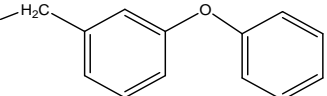
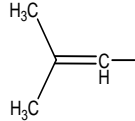
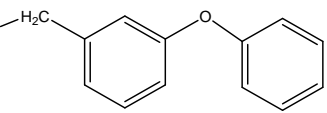
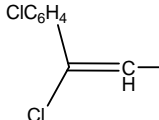
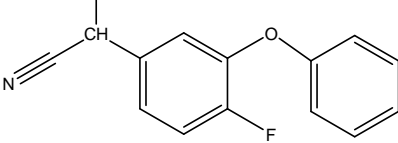
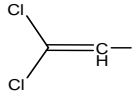
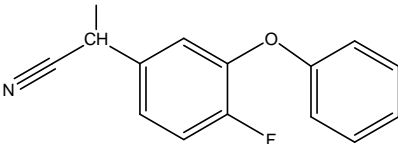
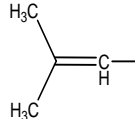
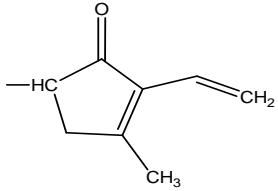
	Piretrina I	Cinerina I	Jasmolina I	Piretrina II	Cinerina II	Jasmolina II
<b>Fórmula química</b>	$C_{21}H_{28}O_3$	$C_{20}H_{28}O_3$	$C_{21}H_{30}O_3$	$C_{22}H_{28}O_5$	$C_{21}H_{28}O_5$	$C_{22}H_{30}O_5$
<b>R<sub>1</sub></b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>
<b>R<sub>2</sub></b>	CH <sub>2</sub> CH=CHCH=C H <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> C H <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=C HCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=C HCHCH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> C H <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH=C HCH <sub>3</sub>
<b>Massa molecular (g/mol)</b>	328.4	316.4	330.4	372.4	360.4	374.4

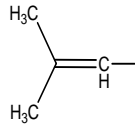
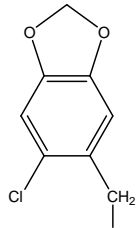
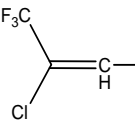
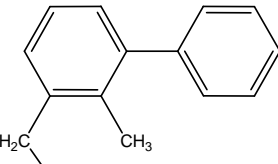
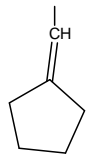
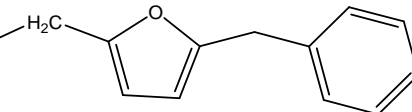
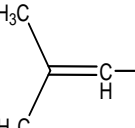
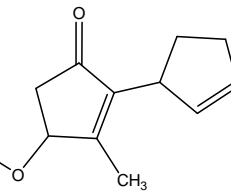
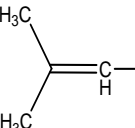
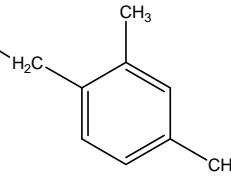
O primeiro piretróide sintético a ser comercializado foi a aletrina que é uma mistura de 8 estereoisômeros com diferentes graus de atividade inseticida e que difere das piretrinas naturais pois nestas cada um dos seis ésteres está presente na configuração mais ativa (Rodobiko, 1994)

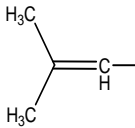
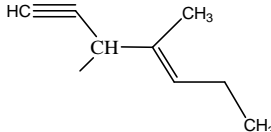
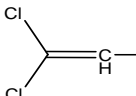
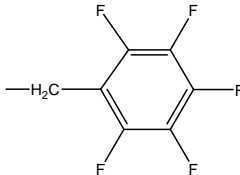
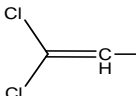
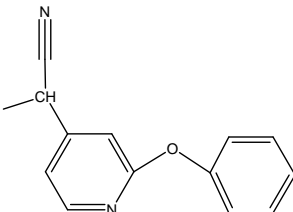
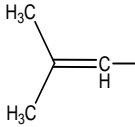
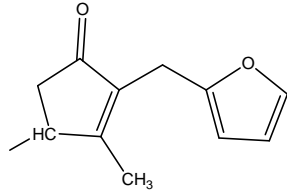
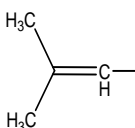
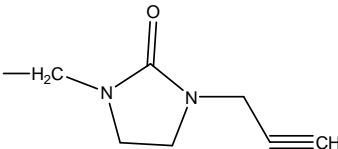
Na Tabela 3.2 encontram-se os piretróides mais frequentemente utilizados, bem como a sua estrutura química, isômeros e grupos substituintes, tendo-se realçado os princípios ativos estudados no âmbito deste estágio (cipermetrina, deltametrina, permetrina e neopinamina). Pela análise desta tabela pode verificar-se que os piretróides podem possuir 1, 2 ou 3 centros quirais, originando assim 2, 4 ou 8 isômeros, respetivamente. (Abad, 2006).

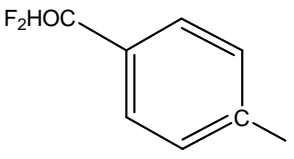
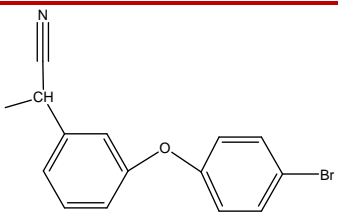
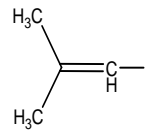
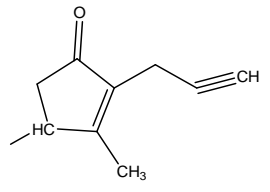
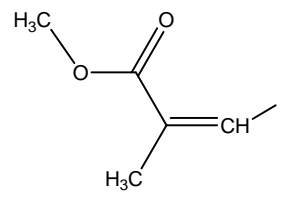
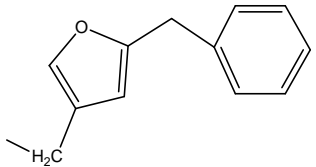
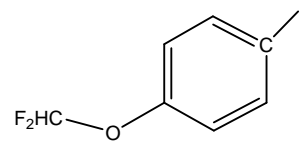
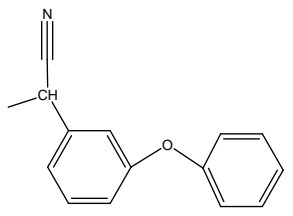
Tabela 3.2 - Estruturas dos piretróides (Pérez-Fernández *et al*, 2010).

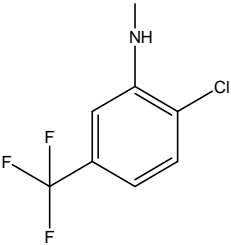
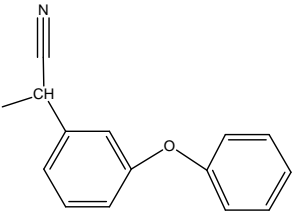
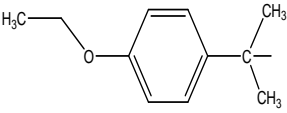
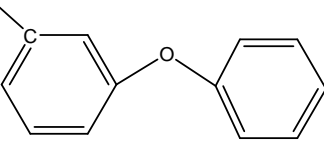
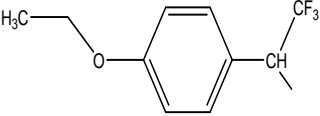
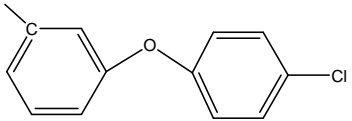
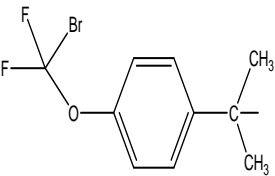
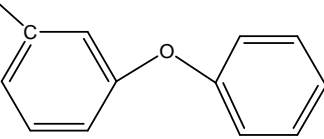
Estrutura	Nome (número dos estereoisômeros)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
			
	Acrinatrina (8)		
	Cialotrina (8)		
	Cipermetrina (8)		
	Cifenotrina (8)		
	Deltametrina (8)		

Estrutura	Nome (número dos estereoisômeros)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	<b>Permetrina (4)</b>		
	<b>Fenotrina (4)</b>		
	<b>Flumetrina (8)</b>		
	<b>Ciflutrina (8)</b>		
	<b>Aletrina (8)</b>		

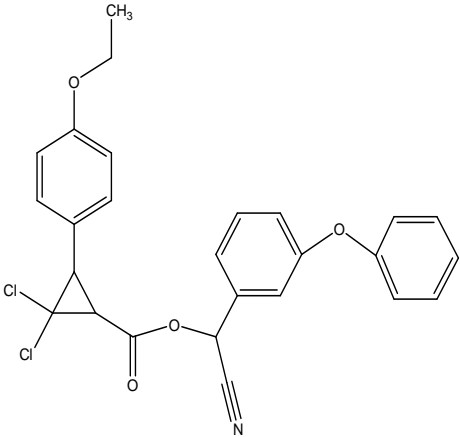
Estrutura	Nome (número dos estereoisômeros)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	Bartrina (4)		
	Bifentrina (4)		
	Bioetanometrina (4)		
	Cicletrina (8)		
	Dimetrina (4)		

Estrutura	Nome (número dos estereoisômeros)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	Empentrina (8)		
	Fenflutrina (4)		
	Fenpiritrina (8)		
	Furetrina (8)		
	Imiprotrina (4)		

Estrutura	Nome (número dos estereoisômeros)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
	Broflutrinato (4)		
	Praletrina (8)		
	Piresmetrina (4)		
	Flucitrinato (4)		

Estrutura	Nome (número dos estereoisômeros)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
$R_1-CH_2-O-CH_2-R_2$	Fluvalinato (4)		
	Etofenprox (1)		
	Flufenprox (2)		
	Halfenprox (1)		



Estrutura	Nome (número dos estereoisômeros)	$R_1$	$R_2$
	Cicloprotrina(4)		

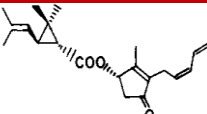
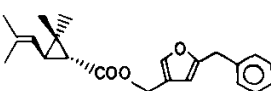
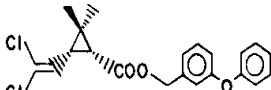
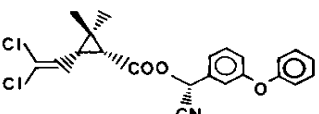
A toxicidade dos piretróides depende da estrutura química e da sua configuração. Exemplo disso é o grupo das piretrinas, onde a piretrina II é responsável pelo “*Knockdown*” (paralisação imediata e temporária, após a qual o inseto recupera) e a piretrina I é responsável pela morte propriamente dita do inseto. A diferença estrutural do piretróide resulta em diferentes modos de atuação, como no caso já referido da piretrina, em que a mudança do grupo metila para o grupo metoxicarbonila da piretrina I para a piretrina II, provoca um aumento da polaridade da molécula o que, afeta a velocidade de penetração e origina o “*knockdown*”. Já os efeitos mais prolongados que originam a morte do inseto estão relacionados com a lipofilia da piretrina I (Rodobiko, 1994 e Pérez-Fernández *et al*, 2010).

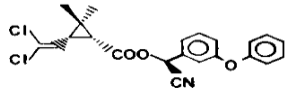
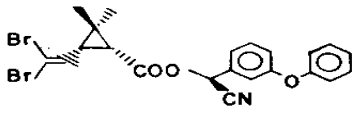
A toxicidade varia com a razão *cis/trans*, sendo que a configuração *cis* de um piretróide é mais tóxica que a sua configuração *trans* (Santos *et al*, 2007).

Existem, no entanto, piretróides que apenas têm um enantiômero ativo na sua formulação, como é o caso da cipermetrina, em que a sua atividade inseticida está apenas associada ao 1R,*cis*, $\alpha$ S e 1R,*trans*, $\alpha$ S e os restantes 6 isómeros demonstraram-se inativos (Pérez-Fernández *et al*, 2010).

Para melhor compreender os efeitos da estrutura dos piretróides nos insetos, Elliott e Janes (Elliott e Janes, 1979) realizaram estudos de correlação estrutura/atividade dos piretróides, os quais estão sintetizados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Atividade relativa de alguns piretróides para dois tipos diferentes de insetos (Rodobiko, 1994).

Estrutura/Piretróide	Mosca doméstica	Besouro da mostarda
 <b>piretrina I</b>	2	160
 <b>bioresmetrina</b>	100	100
 <b>(1R,<i>cis</i>)- permetrina</b>	180	270
 <b>(1R,<i>cis</i>, <math>\alpha</math>R)- cipermetrina</b>	65	140

Estrutura/Piretróide	Mosca doméstica	Besouro da mostarda
 <p><b>(1R,cis,αS)- cipermetrina</b></p>	1900	4400
 <p><b>deltametrina</b></p>	1900	3700

Constata-se, então, a influência da configuração *S* em relação à configuração *R*, uma vez que o composto *(1R,cis,αS)cipermetrina* apresenta maior eficácia que o composto de configuração *R* o *(1R,cis,αR)cipermetrina*. A deltametrina é também um composto que apresenta uma boa eficácia (Rodobiko, 1994).

A nível ambiental, os piretróides são utilizados como modelos para o estudo da ecotoxicologia, uma vez que contaminam o ar, a terra e a água, provocando efeitos quer em microrganismos unicelulares como as bactérias, quer em seres mais complexos como o ser humano. Estes inseticidas são tóxicos para artrópodes aquáticos, abelhas e peixes (Santos *et al*, 2007).

Os piretróides podem ser degradados por um ou mais processos bióticos e abióticos, ou seja podem ser degradados através de plantas, animais e microrganismos ou através da luz. Os isómeros *cis* são degradados mais facilmente que os *trans*, ou seja o isómero menos ativo persiste no meio ambiente mais tempo que o isómero com mais atividade inseticida (Pérez-Fernández *et al*, 2010).

### 3.4. Agentes Biológicos

Devido às consequências demonstradas pelos inseticidas anteriormente descritos, houve a necessidade de desenvolver produtos naturais com poucos ou nenhuns efeitos colaterais, tendo-se criado os agentes microbianos, reguladores de crescimento e feromonas.

Os agentes microbianos são inseticidas que contêm microrganismos ou produtos sintetizados por eles, tirando partido do facto dos insetos serem suscetíveis ao ataque de vírus ou bactérias. Exemplo deste tipo de inseticidas é a bactéria *Bacillus thuringiensis* que produz uma toxina que danifica a larva dos insetos.

Os agentes reguladores de crescimento são substâncias químicas, naturais ou sintéticas que intervêm no processo natural de crescimento, desenvolvimento ou reprodução dos insetos.

As feromonas são compostos químicos segregados por organismos para estabelecer comunicação com outros indivíduos da mesma espécie, provocando a modificação do comportamento animal (Santos, 2001).

### 3.5. Inseticidas Estudados

Como foi referido anteriormente, no âmbito do estágio foram desenvolvidos métodos de análise cromatográfica para a determinação de princípios ativos em seis inseticidas, sendo que dois desses inseticidas foram objeto de estudo durante o estágio, o inseticida do cliente *Sinclair* e o inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*, com o mesmo princípio ativo, a deltametrina.

A deltametrina, um inseticida botânico da classe dos piretróides, é um princípio ativo comum a muitos inseticidas, que foi sintetizado em 1974 e comercializado em 1982. A sua fórmula química é  $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$  e quimicamente é um isômero de oito estereoisômeros ésteres do análogo dibromo do ácido crisantêmico, ou seja, (*S*)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibenzil-(1*R*)-cis-3(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato (Montanha e Pimpão, 2012 e Pavan *et al*, 1999). A sua estrutura molecular e a dos seus estereoisômeros encontram-se representadas na Figura 3.2.

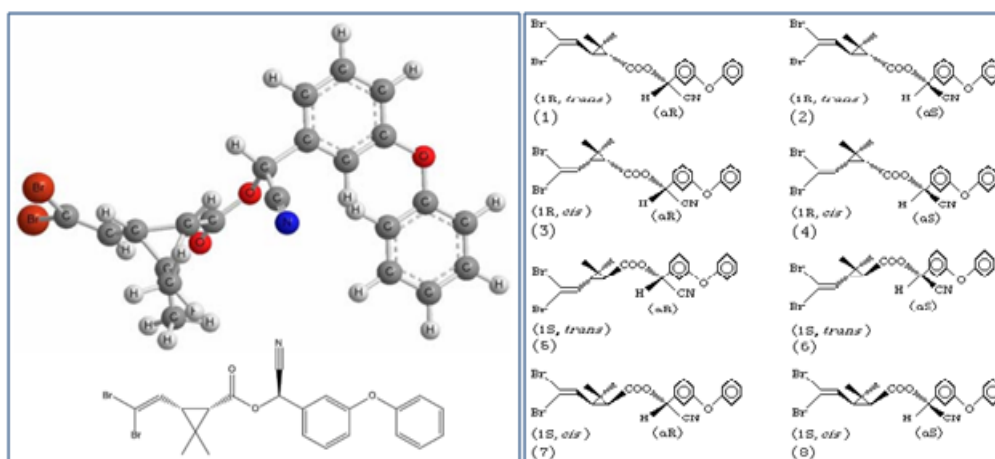


Figura 3.2 – Estrutura molecular da deltametrina e estrutura dos oito estereoisômeros (Johnson *et al*, 2010 e Environmental Health Criteria, 1997).

A sua grande extensão de atividade constitui uma das vantagens deste inseticida, uma vez que a deltametrina atua nos insetos do grupo *Lepidoptera* (inclui borboletas, traças, etc), *Hemiptera* (é uma ordem de insetos que incluiu mais de 67 500 espécies), *Diptera* (grupo que contém mais de 120 000 espécies) e *Coleoptera* (ordem de insetos mais conhecidos como os besouros) (IARC,1991).

É considerado um dos inseticidas mais poderosos e tóxicos entre os piretróides, tratando-se de um pó cristalino, sem cor nem odor, lipofílico, ou seja, solúvel em gorduras, mas insolúvel em água, e é muito persistente no ambiente, sendo estável à luz, humidade e ar (Montanha e Pimpão, 2012 e Bhanu *et al*, 2010).

A deltametrina atua sobre os insetos exercendo um efeito sobre os canais de sódio dos filamentos nervosos, bloqueando a sua abertura e fecho, prolongando o tempo de entrada dos iões de  $Na^+$  para o interior da célula e atrasando o seu encerramento. Atuam também sobre o complexo recetor inotrópico do ácido gama amino butírico (GABA), ligando-se aos recetores

do GABA bloqueando assim os canais de sódio e por consequência a sua ativação, o que leva à hiperexcitabilidade do sistema nervoso central (Montanha e Pimpão, 2012 e Santos *et al*, 2007).

A deltametrina é utilizada numa vasta variedade de culturas, pelo que é importante o seu controlo, uma vez que por um lado a maior exposição da população à deltametrina advém dos resíduos deste inseticida que subsistem nos alimentos, e por outro, a degradação da deltametrina depende da intensidade da radiação solar a que está sujeita (Santos *et al*, 2007). A maior consequência da exposição direta à deltametrina nos humanos é a paralisia e, após exposição cutânea, os sintomas demonstrados são formigamento, comichão, ardor e dormência da pele.

Na Tabela 3.4 encontram-se algumas propriedades físicas da deltametrina que se encontravam nas folhas de especificação do princípio ativo fornecidas pela empresa.

Tabela 3.4 – Algumas propriedades da deltametrina.

Massa molecular (g/mol)	Solubilidade na água (mg/L)	Ponto de ebulição (°C)	Massa volúmica (g/cm <sup>3</sup> )
505,21	0,002-0,0002	300	0,55

Com o decorrer do estágio houve a necessidade de desenvolver métodos de análise cromatográfica para novos inseticidas que iriam entrar em produção. Para isso, foi necessário proceder-se ao estudo de cada princípio ativo presente nos inseticidas a fim de se conhecer as suas características e, consequentemente, poder antecipar o seu comportamento em termos de análise cromatográfica.

Os inseticidas para primeira produção estudados no âmbito do estágio, são de dois clientes distintos, o cliente *Aragon* e o cliente *Rentokil*, sendo que ambos pretendiam que se produzisse dois inseticidas, com princípios ativos diferentes. Será denominado inseticida *Aragon I* aquele que contém na sua formulação os princípios ativos permetrina, cipermetrina, neopinamina e butóxido de piperonilo e *Aragon II* o inseticida que contém para além dos quatro princípios ativos anteriores o bendiocarbe, *Rentokil I* é a denominação seguida para o inseticida que contém o princípio ativo permetrina e, finalmente, *Rentokil II* o inseticida que contém deltametrina como único princípio ativo.

De seguida encontram-se as propriedades dos princípios ativos destes inseticidas, expeto do inseticida *Rentokil II* cujo princípio ativo é a deltametrina, que já foi descrita anteriormente.

A permetrina (PER), cipermetrina (CIP) e neopinamina (NEO) são da classe dos piretróides, atuando assim no sistema nervoso central e periférico das espécies a eliminar, mas como esse efeito é temporário utiliza-se um composto sinérgico, que é o butóxido de piperonilo (PBO). O bendiocarbe (BEN) é um inseticida carbamato e é utilizado na agricultura e na saúde pública, uma vez que este inseticida é usado como um fator de controlo de doenças. As principais propriedades dos diversos princípios ativos referidos que se

Inseticidas encontravam nas folhas de especificação de cada princípio ativo fornecidas pela empresa encontram-se indicadas na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5 – Algumas propriedades do butóxido de piperonilo, neopinamina, permetrina, cipermetrina e bendiocarbe**

Princípio ativo	Fórmula Química	Massa molecular (g/mol)	Número de estereoisômeros	Solubilidade na água (mg/L)	Ponto de ebulição (°C)	Massa Volúmica (g/cm <sup>3</sup> )
PBO	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	338,44	Não tem	0,001	180	1,06
NEO	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	331,41	4	Insolúvel	185-190	1,11
PER	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	391,29	4	Insolúvel	200	1,19
CIP	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	416,30	8	Insolúvel	170-195	1,12
BEN	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub>	223,23	Não tem	-	298	1,20



## 4. MÉTODO DE ANÁLISE PARA QUANTIFICAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS EM INSETICIDAS

A cromatografia é a técnica analítica mais utilizada na separação e quantificação de piretróides.

A cromatografia embora seja uma técnica de separação é frequentemente utilizada na análise química. É utilizada, também, na preparação de substâncias puras, no estudo da cinética das reações, investigações da estrutura molecular e na determinação de constantes físico-químicas tais como a entalpia, entropia e energia livre (Scott, 2003 e Robert e Eugene, 2004).

A classificação das diferentes formas de cromatografia depende de vários critérios, como por exemplo, o processo de separação, que pode ser, por adsorção, partição, permuta iónica, exclusão de tamanhos e afinidade. Na cromatografia por adsorção ocorrem reações interfaciais onde as substâncias líquidas ou gasosa são enriquecidas numa fase sólida. A cromatografia por partição baseia-se na separação pelas diferentes solubilidades dos analitos nas duas fases: a fase estacionária é um líquido imiscível com a fase móvel. Quando a separação ocorre devido às diferenças de afinidade de troca iónica dos analitos individuais, está-se perante a cromatografia de permuta iónica. Na cromatografia de exclusão molecular, a separação dá-se de acordo com o tamanho molecular, sendo utilizada como fase estacionária sílica gel ou resinas que contêm uma estrutura de poro definida e, que possibilitam que os analitos menores possam difundir nos poros e ser retardados, enquanto as moléculas maiores, com menor interação com os poros, são completamente excluídas, eluindo mais rapidamente. Na cromatografia por afinidade é permitida a separação de misturas de substâncias pela seletividade ou por forças de interação específicas (Eith *et al*, 2006).

Em todas as separações cromatográficas usa-se uma fase móvel e uma fase estacionária, e a classificação do tipo de cromatografia baseia-se na natureza física da fase móvel, se esta for um gás estamos perante a cromatografia gasosa, se por sua vez, for um líquido, o processo é designado por cromatografia líquida (Scott, 2003).

A cromatografia gasosa pode ser combinada com vários detetores sensíveis, como o de captura de eletrões (ECD), de fosforo-azoto (NPD), o de ionização de chama (FID) e a espectrometria de massa (MS) (Barbosa, 2012).

### 4.1. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é a técnica mais utilizada na separação de substâncias voláteis ou semi-voláteis que são arrastadas por uma fase móvel através de uma fase estacionária. Esta técnica baseia-se no princípio da diferença de velocidade da migração de componentes gasosos através de um meio poroso (Augusto, 2011). No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações pelo facto da amostra ser analisada em fase gasosa, implicando que os analitos sejam voláteis e termicamente estáveis (Silva, 2009). Na Figura 5.1, apresenta-se um esquema típico de montagem usado para cromatografia gasosa.



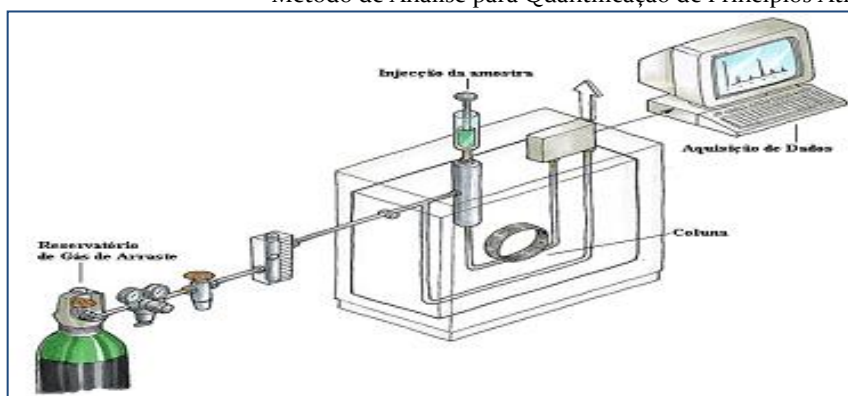


Figura 4.1 - Esquema de uma montagem típica de GC (Ferreira, 2010).

Um cromatógrafo de fase gasosa é constituído por um injetor, uma fase móvel (gás), uma coluna de separação que contém a fase estacionária e um detetor. Inicialmente a amostra é introduzida numa corrente de gás puro e inerte (hélio, azoto ou hidrogénio) que atua como gás de arraste. A escolha do tipo de gás a utilizar vai depender do tipo de detetor utilizado e dos compostos a detetar. De seguida a amostra percorre a coluna que se encontra no interior de um forno, e na qual os compostos vão ser separados devido à diferença de afinidade entre a fase móvel (gás) e a fase estacionária e de pontos de ebulição. Assim, um componente com pouca afinidade para a fase estacionária e com um ponto de ebulição baixo elui mais rapidamente. À medida que as substâncias eluem da coluna vão sendo quantificadas por um detetor (Silva, 2009 e Kitson, 1996).

Um cromatógrafo gasoso deve ser capaz de:

- ✓ Fornecer um fluxo constante do gás de arraste (fase móvel);
- ✓ Permitir a introdução de vapores da amostra na corrente do gás que flui através da coluna;
- ✓ Conter o comprimento adequado de fase estacionária;
- ✓ Manter a coluna a uma temperatura apropriada (ou o programa de sequência de temperatura);
- ✓ Detetar os componentes da amostra conforme eluem da coluna;
- ✓ Permitir um sinal de leitura proporcional em magnitude com a quantidade de cada componente.

Normalmente a injeção da amostra é efetuada através de uma seringa que é inserida no injetor que se encontra a uma temperatura 50°C acima da temperatura de ebulição do componente menos volátil que constitui a mistura a analisar. A seringa perfura o septo de modo a encontrar a câmara de vaporização que está a uma temperatura acima do ponto de ebulição dos componentes a separar, para que a amostra se volatilize instantaneamente, usualmente encontra-se a temperaturas entre os 150 e os 250°C. As temperaturas não podem ser muito mais elevadas para não se correr o risco de ocorrer degradação térmica da amostra (Ferreira, 2010 e Silva, 2009).

A injeção pode ser efetuada de três maneiras diferentes. De forma direta, quando as amostras se degradam a temperaturas acima do seu ponto de ebulição, sendo, então, a amostra

Método de Análise para Quantificação de Princípios Ativos em Inseticidas injetada diretamente na coluna sem passar pelo injetor. Em modo *split*, ou seja, em modo de divisor de fluxo, onde somente uma parte do vapor entra na coluna sendo o vapor restante desprezado. E, por fim, a injeção pode ser, dada em modo *splitless* em que todo o vapor entra na coluna. Na Figura 5.2 representam-se os modos *split* e *splitless* (Agilent Technologies, 2002 e Silva, 2009).

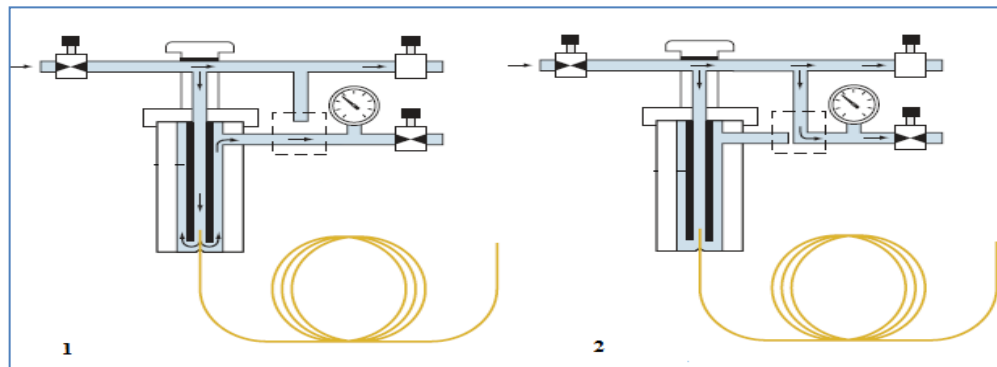


Figura 4.2 - (1) – injeção em modo *split* (2) – injeção em modo *splitless* (adaptado de Agilent Technologies, 2002).

A separação dos analitos da amostra é efetuada em colunas, sendo que as mais comuns são as empacotadas e as capilares, que são as mais utilizadas em cromatografia gasosa. As suas dimensões podem variar, possuindo normalmente diâmetro interno compreendido entre 0,25 e 0,5 milímetros e comprimento entre 20 e 100 metros. Podem ser construídas em aço inoxidável, sílica fundida, vidro ou teflon (Alves, 2005; Silva, 2009).

Existem diferentes tipos de fase estacionária, e cada uma está indicada para diferentes tipos de análises. Uma boa fase estacionária tem que ter características próximas das dos solutos a serem separados, uma boa seletividade, ser quimicamente inerte relativamente à amostra, possuir uma volatilidade baixa, ser pura e pouco viscosa (Skoog et al, 2004).

A temperatura da coluna é controlada de acordo com um programa de temperaturas estabelecido, sendo normalmente usado um intervalo de temperaturas compreendido entre os 40 e os 350°C. É importante que o forno consiga variar rapidamente a temperatura da coluna de modo a não existirem gradientes de temperatura no seu interior, pelo que o forno necessita de um sistema que promova o fluxo do ar quente. (Alves,2005). Na Figura 4.3 apresenta-se o interior do cromatógrafo gasoso utilizado no desenvolvimento de métodos na empresa.



Figura 4.3 - Interior de um forno de GC.

Como já foi referido anteriormente, existem vários detetores utilizados em cromatografia gasosa, mas o detetor acoplado ao equipamento utilizado durante o trabalho desenvolvido no âmbito do estágio foi o detetor por ionização de chama, FID.

O detetor por ionização de chama é tradicionalmente utilizado em análises químicas, pelo facto de responder a praticamente todos os compostos orgânicos com uma sensibilidade favorável, de a sua resposta não ser afetada por alterações no caudal, pressão ou temperatura, e, ainda, pelo facto de não responder a impurezas comuns no gás de arraste.

O princípio de operação deste detetor, cujo esquema se apresenta na Figura 4.4, consiste na mistura do hidrogénio com os gases que eluem da coluna, e o seu posterior direccionamento para uma pequena chama de difusão de hidrogénio-ar, existente no final do jato (Gonçalves, 1996).

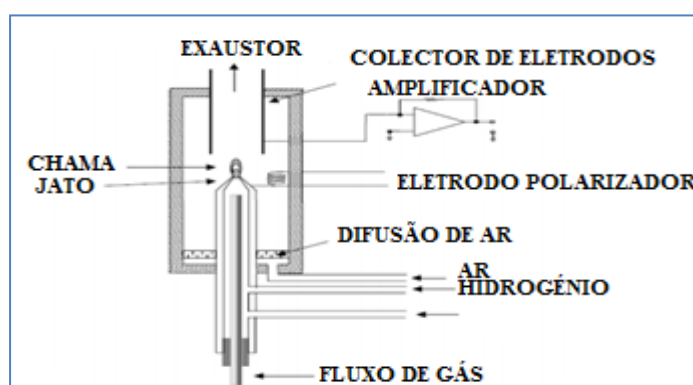


Figura 4.4 - Ilustração do mecanismo de funcionamento de um detetor FID (Adaptado de Robert *et al* 2004).

À medida que as substâncias orgânicas chegam à chama, formam-se espécies eletricamente carregadas que são recolhidas por um par de elétrodos colocados acima da chama e polarizadas por uma diferença de potencial de duas ou três centenas de volts, produzindo, assim, um aumento de corrente proporcional à quantidade de carbono na chama. A corrente resultante é amplificada por um eletrómetro.

O FID responde ao número de átomos de carbono que entram no detetor por unidade de tempo. O fator de resposta do FID é dado pela área, ou altura, do pico registado no cromatograma, dividida pela massa de soluto injetado. A resposta é afetada pela presença de átomos tais como o oxigénio e o enxofre, e de compostos halogenados, não se alterando perante substâncias que não formam iões na chama, uma vez que não geram sinal. A seguinte tabela contém a lista de compostos que apresentam pouca, ou nenhuma resposta, no detetor FID (Gonçalves, 1996).

**Tabela 4.1 - Compostos com baixa ou nenhuma resposta no detetor FID (Adaptado de Robert *et al* 2004).**

He	N <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	NO	CCl	Xe
Ar	O <sub>2</sub>	CS <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O	SiCl <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O
Kr	CO	COS	NO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> SiCl <sub>3</sub>	SO <sub>3</sub>
Ne	CO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SiF <sub>4</sub>	HCN
			NH <sub>3</sub>	SiHCl <sub>3</sub>	



## 5. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

O desenvolvimento de um métodos analítico serve para identificar (Análise Qualitativa) e/ ou quantificar (Análise Quantitativa) compostos químicos (Gonçalves, 1996).

A análise quantitativa por cromatografia serve para determinar a quantidade de uma espécie, ou elemento químico, numa amostra, sendo os métodos para relacionar o sinal do detetor e a quantidade do componente em estudo os seguintes: a normalização, a padronização interna, o método de adições e a padronização externa (Augusto, 2011).

O método de quantificação utilizado em todos os métodos desenvolvidos para a quantificação de princípios ativos em inseticidas foi a padronização interna, que fornece o cálculo independente de cada pico cromatográfico, e consiste em adicionar um padrão interno à solução antes de ser injetada no cromatógrafo (Augusto, 2011 e Agilent Technologies, 2002). A substância escolhida para padrão interno deve apresentar algumas características, tais como: eluir separado de todos os compostos da amostra; ser estável nas condições de análise; ser injetada numa quantidade próxima à da substância em análise (Augusto, 2011).

Para a implementação de um método cromatográfico é necessário a preparação de três soluções; uma solução com o padrão interno (*ISTD*); uma solução padrão (*padrão*) com uma massa conhecida de princípio ativo e volume conhecido da solução padrão interno; e finalmente, uma solução amostra (*amostra*), com uma massa conhecida de inseticida a analisar e o mesmo volume da solução de padrão interno adicionado na solução padrão, na Figura 5.1 encontra-se um esquema explicativo da preparação das soluções referidas anteriormente.

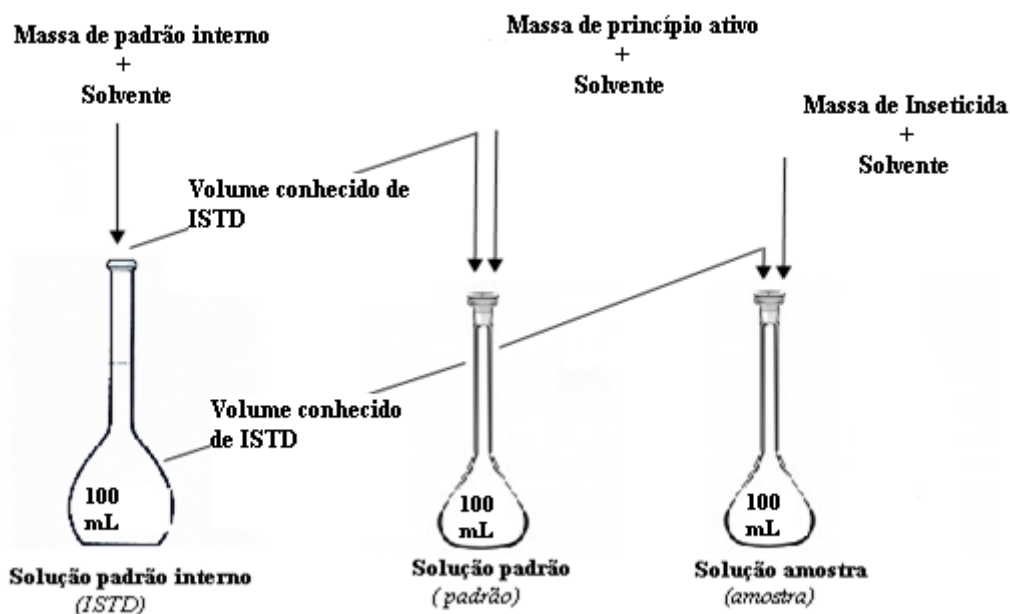


Figura 5.1 – Esquema da preparação das soluções para a quantificação de princípios ativos em inseticidas.

Após a injeção das soluções padrão e amostra no cromatógrafo obtém-se dois cromatogramas, cujas áreas dos picos cromatográficos correspondentes ao ISTD e ao princípio ativo devem ser quantificadas. Um esquema ilustrativo dos cromatogramas encontra-se na Figura 5.2 onde  $A(ISTD)_{padrão}$  é a área do pico cromatográfico do padrão interno na solução padrão,  $A(ISTD)_{amostra}$  é a área do pico cromatográfico do padrão interno na solução amostra,  $A(ativo)_{padrão}$  é a área do pico cromatográfico do princípio ativo na solução padrão e  $A(ativo)_{amostra}$  é a área do pico cromatográfico do princípio ativo na solução amostra.

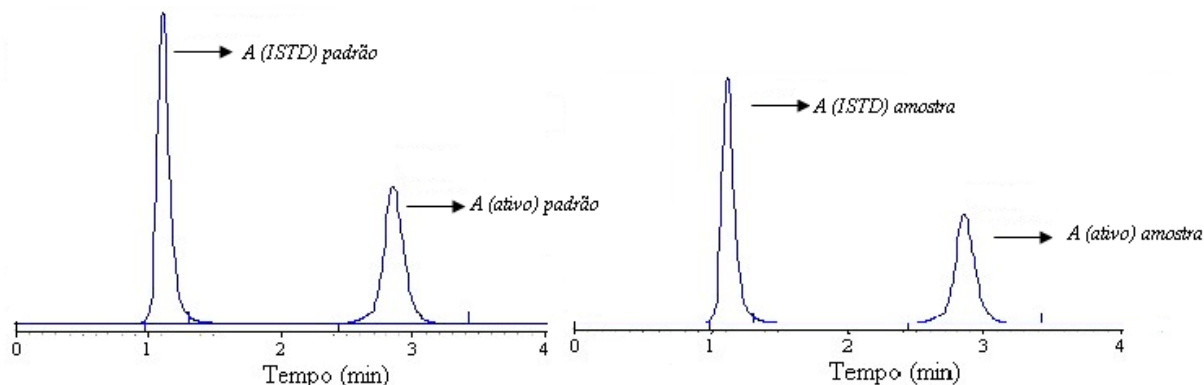


Figura 5.2 – Esquema explicativo dos cromatogramas obtidos com a solução padrão e amostra.

Com base nos resultados obtidos é possível calcular a concentração de princípio ativo na solução amostra  $C(atvivo)_{amostra}$ , usando a equação seguinte:

$$C(atvivo)_{amostra} = \frac{A(ativo)_{amostra}}{A(ISTD)_{amostra}} \times \frac{1}{RRF_{padrão}} \times C(ISTD)_{amostra} \quad \text{Eq. 5.1}$$

em que,  $RRF_{amostra}$  é o fator de resposta relativo obtido da razão entre os fatores de resposta do analito,  $FR(ativo)_{padrão}$ , e do ISTD,  $FR(ISTD)_{padrão}$ , calculados a partir do cromatograma obtido com a solução padrão da seguinte forma:

$$FR(ativo)_{padrão} = \frac{A(ativo)_{padrão}}{C(ativo)_{padrão}} \quad \text{Eq. 5.2}$$

$$FR(ISTD)_{padrão} = \frac{A(ISTD)_{padrão}}{C(ISTD)_{padrão}} \quad \text{Eq. 5.3}$$

pelo que,

$$RRF_{padrão} = \frac{FR(ativo)_{padrão}}{FR(ISTD)_{padrão}} = \frac{A(ativo)_{padrão}}{A(ISTD)_{padrão}} \times \frac{C(ISTD)_{padrão}}{C(ativo)_{padrão}} \quad \text{Eq. 5.4}$$

Substituindo este resultado na equação 5.1 vem

$$C(atvivo)_{amostra} = \frac{A(ativo)_{amostra}}{A(ISTD)_{amostra}} \times \frac{A(ISTD)_{padrão}}{A(ativo)_{padrão}} \times \frac{C(atvivo)_{padrão}}{C(ISTD)_{padrão}} \times C(ISTD)_{amostra} \quad \text{Eq. 5.5}$$

como  $C(ISTD)_{amostra} = C(ISTD)_{padrão}$  a equação anterior pode ser simplificada,

$$C(ativo)_{amostra} = \frac{A(ativo)_{amostra}}{A(ISTD)_{amostra}} \times \frac{A(ISTD)_{padrão}}{A(ativo)_{padrão}} \times C(ativo)_{padrão} \quad \text{Eq. 5.6}$$

A percentagem de princípio ativo no inseticida,  $\%ativo$ , será, então, calculada através de:

$$\begin{aligned} \%ativo &= \frac{m(ativo)_{amostra}}{m(inseticida)_{amostra}} = \frac{C(ativo)_{amostra} \times V_{amostra}}{m(inseticida)_{amostra}} \\ &= \frac{A(ativo)_{amostra}}{A(ISTD)_{amostra}} \times \frac{A(ISTD)_{padrão}}{A(ativo)_{padrão}} \times \frac{C(ativo)_{padrão}}{m(inseticida)_{amostra}} \times V_{amostra} \end{aligned} \quad \text{Eq. 5.7}$$

em que,  $V_{amostra}$  é o volume da solução amostra preparada e  $m(inseticida)_{amostra}$  é a massa de inseticida adicionada na preparação da solução amostra.

Como  $C(ativo)_{padrão}$  é calculado como:

$$C(ativo)_{padrão} = \frac{m(ativo)_{padrão}}{V_{padrão}} \quad \text{Eq. 5.8}$$

em que,  $m(ativo)_{padrão}$  é a massa de princípio ativo utilizada na preparação da solução padrão para um volume  $V_{padrão}$ . Finalmente a equação 5.7 pode ser escrita como:

$$\%ativo = \frac{m(ativo)_{amostra}}{m(inseticida)_{amostra}} \times \frac{A(ativo)_{amostra}}{A(ativo)_{padrão}} \times \frac{A(ISTD)_{padrão}}{A(ISTD)_{amostra}} \times \frac{V_{amostra}}{V_{padrão}} \quad \text{Eq. 5.9}$$

No caso de se proceder à diluição da solução padrão ou da solução amostra, a equação anterior pode ainda ser escrita da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \%ativo &= \frac{m(ativo)_{amostra}}{m(inseticida)_{amostra}} \times \frac{A(ativo)_{amostra}}{A(ativo)_{padrão}} \times \frac{A(ISTD)_{padrão}}{A(ISTD)_{amostra}} \times \frac{V_{amostra}}{V_{padrão}} \\ &\quad \times \frac{fd, padrão}{fd, amostra} \end{aligned} \quad \text{Eq. 5.10}$$

em que  $fd, padrão$  é o fator de diluição utilizado na preparação da solução padrão e  $fd, amostra$  é o fator de diluição utilizado na preparação da solução amostra.

A análise qualitativa é utilizada quando se pretende identificar a espécie ou elementos químicos presentes numa amostra. O tempo de retenção é característico de um composto e depende da sua solubilidade na fase estacionária. Pode-se, então, identificar os componentes de uma mistura por comparação direta com os tempos de retenção obtidos para soluções padrão, ou com dados publicados na literatura para as mesmas condições de análise (Gonçalves, 1996).

O tempo de retenção de uma dada substância depende:

- ✓ da temperatura da coluna
- ✓ do caudal do gás de arraste
- ✓ do comprimento da coluna
- ✓ do tipo de fase estacionária



Para o processo de validação dos métodos desenvolvidos durante o estágio foi necessário garantir a existência de requisitos mínimos que dependem do método em estudo e compreendem os seguintes parâmetros (RELACRE, 2000):

- ✓ gama de trabalho/linearidade;
- ✓ limite de detecção e limite de quantificação;
- ✓ sensibilidade;
- ✓ precisão;
- ✓ exatidão

Alguns destes parâmetros não foram objeto de estudo, uma vez que no início do estágio estava previsto apenas o desenvolvimento dos métodos e não a sua validação, pelo que não se efetuaram alguns dos ensaios que seriam necessários para a correta determinação de alguns dos parâmetros mencionados anteriormente.

O estudo das medidas referidas anteriormente foi levado a cabo pela determinação dos seguintes parâmetros:

### 5.1. Especificidade/Seletividade

A especificidade e a seletividade são dois parâmetros de avaliação de um método analítico, em que a seletividade é a capacidade do método identificar e distinguir a substância a quantificar na presença de outras substâncias sem a interferência dessas outras substâncias. A especificidade é a garantia que a grandeza medida provém apenas da substância a determinar (RELACRE, 2000).

Para a determinação destes dois parâmetros seria necessário efetuar-se testes de recuperação, os quais não foram realizados (Ferreira, 2010).

### 5.2. Quantificação

Para a avaliação da quantificação é necessário proceder-se à realização de uma curva de calibração. Para isso, preparam-se soluções padrão (em geral são recomendadas pelo menos 10) com concentração conhecida da substância a determinar, às quais se adiciona uma quantidade conhecida de padrão interno. Após a análise das soluções preparadas, constrói-se um gráfico, onde se relaciona a concentração das soluções padrão com razão entre as áreas dos picos cromatográficos da substância a determinar e do padrão interno (fator de resposta).

O intervalo de trabalho é avaliado através do sinal instrumental médio de pelo menos 10 réplicas independentes da primeira e da última solução padrão preparadas para a construção da curva de calibração. Através destes resultados é possível estimar as respetivas variâncias ( $S^2$ ) dos sinais instrumentais e avaliar se existem diferenças significativas entre ambas (a solução padrão 1 e a solução padrão 10), através do cálculo do valor de  $PG$ , definido como: (RELACRE, 2000).

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \quad \text{quando } S_{10}^2 > S_1^2 \quad \text{Eq. 5.11}$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad \text{quando } S_1^2 > S_{10}^2 \quad \text{Eq. 5.12}$$

onde  $S_1^2$  é a variância associada à primeira solução padrão, e  $S_{10}^2$  a variância associada à última solução padrão.

Comparando-se o valor de  $PG$  com o valor tabelado da distribuição  $F$  de Snedecor/Fisher, para  $n-1$  graus de liberdade:

➤ Quando  $PG \leq F$ , a gama de trabalho está bem ajustada e a diferença de variâncias não é significativa;

➤ Quando  $PG > F$ , a gama de trabalho tem que ser diminuída até se obter a situação anterior, pois a diferença de variâncias é significativa.

A determinação da gama de trabalho foi efetuada mas apenas para três réplicas da primeira e última solução padrão e unicamente para os inseticidas dos clientes *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*.

No que diz respeito à linearidade esta pode ser avaliada através da função de calibração linear (obtida de acordo com a norma ISO 8466-1) e a função calibração não linear (obtida de acordo com a norma ISO 8466-2). A equação seguinte permite determinar a diferença de variâncias  $((DS)^2)$ .

$$DS^2 = (N - 2)S_{y/x}^2 - (N - 3)S_{y2}^2 \quad \text{Eq. 5.13}$$

onde  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da reta de regressão linear,  $S_{y2}$  o desvio padrão residual da função da reta de regressão não linear e  $N$  o número de padrões de calibração.

Calculando-se o valor de  $PG$  a partir da equação seguinte poder-se-á comparar esse valor com o valor tabelado da distribuição  $F$  de Snedecor/Fisher e concluir se a função calibração é linear ou não (RELACRE, 2000).

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad \text{Eq. 5.14}$$

Quando  $PG \leq F$ , a função calibração é linear e;

quando  $PG > F$ , a função calibração é não linear.

Poder-se-á avaliar a linearidade através da representação gráfica da função linear ajustada pelo cálculo do respetivo coeficiente de correlação ( $R$ ), devendo este valor ser maior ou igual a 0,995 (Ferreira, 2010).

### 5.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de deteção é o teor mínimo medido através do qual é possível detetar a presença da substância a analisar com uma certeza estatística razoável. Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa que a substância a medir se encontra ausente, apenas a concentração dessa substância é inferior ao limite de deteção (RELACRE, 2000).

O limite de detecção ( $L.D.$ ) pode ser obtido de duas formas distintas, tal como será descrito de seguida: uma que é aplicada na generalidade das situações e outra que é aplicada quando o método em questão envolve uma reta de calibração:

No caso mais geral:

$$L.D. = X_0 + K\sigma_0 \quad \text{Eq. 5.15}$$

em que  $X_0$  é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio e  $\sigma_0$  é o desvio padrão associado a  $X_0$ , sendo o valor de  $K$  de 3,3 quando o valor de  $X_0$  é conhecido e apresenta uma distribuição normal de erros (RELACRE, 2000).

No caso em que o método envolve a utilização de uma calibração linear, o limite de detecção ( $L.D.$ ) é dado por:

$$L.D. = \frac{[3,3 \times S_{x/y}]}{b} \quad \text{Eq. 5.16}$$

onde  $S_{x/y}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração, dada pela equação  $y = a + bx$ , e  $b$  é o declive da mesma.

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i)]^2}{N - 2}} \quad \text{Eq. 5.17}$$

O limite de quantificação corresponde à mais pequena concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito com uma determinada exatidão e precisão, correspondendo na prática ao padrão de calibração de menor concentração (RELACRE, 2000).

No caso geral, o limite de quantificação pode ser obtido a partir de:

$$L.Q. = X_0 + 10\sigma_0 \quad \text{Eq. 5.18}$$

em que  $X_0$  é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos e  $\sigma_0$  é o correspondente desvio padrão associado.

No caso em que o método envolve a utilização de uma calibração linear, o limite de detecção é dado por:

$$L.Q. = \frac{[10 \times S_{x/y}]}{b} \quad \text{Eq. 5.19}$$

onde  $S_{x/y}$  é o desvio padrão da curva de calibração, dada pela equação  $y = a + bx$ , e  $b$  é o declive da mesma (ver Eq.5.17).

#### 5.4. Sensibilidade

A sensibilidade de um método é dada pela diferença mínima entre as concentrações de duas amostras que pode ser distinguida pelo método com um certo grau de confiança. (Ferreira, 2010).

Este parâmetro avalia então a capacidade que o método tem para detetar pequenas diferenças de concentração da substância a analisar, pelo que, a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração, para essa zona de concentração. Logo se a curva de calibração for definida como linear, a sensibilidade será constante ao longo da gama de trabalho e igual ao declive da equação da reta de calibração (RELACRE,2000).

## 5.5. Precisão

O conceito de precisão pode definir-se como a concordância entre os resultados obtidos em vários ensaios, utilizando o mesmo procedimento, materiais idênticos e em condições definidas (RELACRE, 1996). A repetibilidade (precisão obtida nas mesmas condições) e a reprodutibilidade (precisão obtida fazendo variar as condições) são dois métodos de avaliação da precisão.

A precisão está diretamente relacionada com a medida dos erros de natureza aleatória. Estes erros são de natureza indeterminada, podem ser detetados pela repetição da experiência e minimizados através de uma análise estatística e têm uma origem subjetiva (Fonseca, 2004). A precisão calcula-se através de uma análise estatística, admitindo-se que para um grande número de determinações os erros seguem uma distribuição normal, ou seja, uma distribuição de Gauss.

Para uma dada experiência onde se obteve um determinado conjunto de valores  $x_1, x_2, \dots, x_n$  para  $n$  ensaios, verifica-se que existe uma dispersão de valores, distribuindo-se em torno de um valor central que é a média, seguindo uma distribuição normal, traduzida pela função seguinte:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x - \bar{x})^2}{2\sigma^2}\right) \quad \text{Eq. 5.20}$$

Na equação que traduz a função da distribuição normal, os parâmetros  $\bar{x}$  e  $\sigma$ , representam, respetivamente, a média e o desvio padrão, e são definidos como:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Eq. 5.21}$$

$$\sigma = \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \right]^{1/2} \quad \text{Eq. 5.22}$$

Para averiguar se os resultados seguem uma distribuição normal, é necessário efetuar o teste *Kolmogorov-Smirnov*. Para aplicar-se este teste é necessário determinar duas funções, a função  $F(x)$  que representa a função teórica acumulada e a função  $G(x)$  que representa a função observada acumulada para calcular o valor de  $D_{exp}$ , através da seguinte equação (Ferreira 2010, Thompson e Lowthian, 2011):

$$D_{exp} = \max |F(x) - G(x)| \quad \text{Eq. 5.23}$$

e comparar com o valor de  $D$  tabelado. Se  $D_{exp} < D_{tab}$  pode-se afirmar que os valores experimentais seguem uma distribuição normal, mas se  $D_{exp} > D_{tab}$  os valores experimentais não seguem uma distribuição normal.

O desvio padrão indica a precisão de um resultado isolado, enquanto o desvio padrão médio ( $\sigma_m$ ) dá a precisão de um conjunto de dados, sendo calculado pela seguinte expressão (Gonçalves, 1996).

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad \text{Eq. 5.24}$$

Um outro parâmetro muito usado para refletir a precisão é o coeficiente de variância (CV). O coeficiente de variância em métodos de determinação de macroquantidades requer um valor de 1 a 2 % e em métodos que contenham impurezas o valor aceitável poderá ser de até 20 %, dependendo da complexidade da amostra, e é calculado através da seguinte equação (Ferreira, 2010).

$$CV(\%) = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100\% \quad \text{Eq. 5.25}$$

## 5.6. Exatidão

A exatidão é uma medida de proximidade do resultado experimental ao verdadeiro valor, e é afetada pelos erros sistemáticos, ou seja, que não se detetam pela repetição das experiências, pelo que não é possível efetuar a sua análise estatística, mas podem ser eliminados introduzindo fatores corretivos ou ensaios em branco (Gonçalves, 1996).

Os erros sistemáticos podem ser classificados em três categorias: os erros instrumentais, por exemplo, a má calibração do equipamento e avarias parciais; erros operativos, inerentes aos erros cometidos pelos analistas, e os erros do método, que estão associados a interferências de vária ordem e à existência de reações secundárias no método analítico (Ferreira, 2010).

A exatidão de um método pode ser determinada através de materiais de referência certificados (MRC), ensaios interlaboratoriais ou testes comparativos. Um MRC possui um valor de concentração (ou outra grandeza) para cada princípio ativo e a sua aquisição deverá ser efetuada através do fornecedor reconhecido e confiável (RELACRE, 2000).

Para calcular a exatidão de um método é necessário determinar o erro relativo ( $Er$ ), expresso em percentagem, que é dado pela seguinte equação:

$$Er(\%) = \frac{(\bar{x} - x_v)}{x_v} \times 100\% \quad \text{Eq. 5.26}$$

Onde  $\bar{x}$  é a média dos valores obtidos experimentalmente e  $x_v$  o valor considerado como verdadeiro. Um valor de  $Er$  inferior ou igual a 5% é considerado satisfatório.

O cálculo dos erros sistemáticos pode ser efetuado através do teste de hipóteses (teste t), cuja equação é dada por:

$$t_{cal} = \frac{(\bar{x} - x_v) \cdot \sqrt{n}}{\sigma} \quad \text{Eq. 5.27}$$

O valor de  $t$  (em módulo) vai ser comparado com o valor de  $t$  da distribuição de *Student* para  $n-1$  graus de liberdade. Se:

- $|t_{cal}| \leq t$  então, o ensaio é satisfatório, uma vez que não ficou estatisticamente evidenciado a existência de erros sistemáticos;
- $|t_{cal}| > t$  então, o ensaio não é satisfatório porque ficou evidenciado estatisticamente a existência de erros sistemáticos.

É necessário também calcular o fator de desempenho ( $Z$ ) do método, através da seguinte equação:

$$Z = \frac{(\bar{x} - x_v)}{I} \quad \text{Eq. 5.28}$$

onde  $I$  é a incerteza associada ao valor do MRC utilizado, podendo-se concluir que:

- se  $Z \leq 2$ , indica que o fator de desempenho é satisfatório;
- se  $2 < Z \leq 3$ , o fator de desempenho é questionável;
- se  $Z > 3$ , traduz que o fator de desempenho é incorreto.

A exatidão pode ser medida através da razão entre o valor medido experimentalmente para a percentagem do princípio ativo no inseticida e o valor considerado esperado da percentagem do princípio ativo no inseticida.

$$\%Exatidão = \frac{\text{valor medido}}{\text{valor esperado}} \times 100\% \quad \text{Eq. 5.29}$$

## 5.7. Robustez

A robustez é uma medida que permite determinar a sensibilidade que o método apresenta face a pequenas variações de fatores que condicionam o método. Pode-se afirmar que um método é robusto quando este se revela insensível a pequenas variações provocadas durante a sua execução.

No presente relatório de estágio a robustez não foi determinada, uma vez que era necessário efetuar o teste de YOUNDEN, que pressupõe a realização de até oito ensaios executados segundo um plano de controlo de fatores que influenciam o processo (RELACRE, 2000). Dado o período de tempo reservado para o estágio não foi possível o estudo referido que permitiria a medição da robustez dos métodos melhorados/desenvolvidos.



## 6. EXECUÇÃO EXPERIMENTAL E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Este capítulo, reservado à apresentação dos resultados experimentais e à sua discussão, está dividido em duas partes. A primeira parte é dedicada ao estudo do princípio ativo deltametrina para o melhoramento/desenvolvimento dos métodos da sua quantificação nos inseticidas dos clientes *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*, e na segunda parte será apresentado o desenvolvimento dos restantes métodos de análise de inseticidas para diferentes clientes. Optou-se por esta organização, uma vez que no início do estágio, a COLEP propôs que fosse melhorado um método já desenvolvido para a determinação da deltametrina para vir a ser aplicado a dois inseticidas dos clientes *Sinclair* e o *Gerhardt Pharmaceuticals*, devido ao facto de apresentar problemas de adequação aos requisitos do cliente, pois a percentagem de ativo no inseticida não se encontrava dentro das especificações que o cliente considerava corretas para a formulação fornecida. Entretanto, com a chegada de diferentes inseticidas à empresa, nomeadamente o *Aragon I*, *Aragon II*, *Rentokil I* e *Rentokil II*, foi necessário proceder ao desenvolvimento de novos métodos de análise para os princípios ativos presentes nestes inseticidas. Face à urgência do departamento de desenvolvimento em dar resposta a esta necessidade dos clientes, o desenvolvimento dos novos métodos tornou-se prioritário, pelo que, essa tarefa foi incluída nos objetivos do estágio.

### 6.1. Melhoramento e validação do método de determinação do teor da deltametrina aplicado aos inseticidas *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*

Para determinar a fração de deltametrina nos inseticidas fornecidos pelos clientes *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*, houve necessidade de aperfeiçoar um método cromatográfico já existente na empresa e, posteriormente, proceder à sua validação.

Nas secções seguintes serão apresentados os reagentes, o material e o equipamento usado durante a fase de estudo e melhoramento do método, assim como, as condições de operação usadas e o estudo dos parâmetros necessários à validação dos métodos para ambos os inseticidas.

#### 6.1.1. Reagentes, Material e Equipamento

Na Tabela 6.1 apresentam-se os reagentes utilizados no desenvolvimento do método para os dois inseticidas, assim como os fornecedores e o respetivo grau de pureza, os seus riscos, e cuidados a ter no seu manuseamento.



**Tabela 6.1 - Lista de reagentes utilizados no método do inseticida *Sinclair* e no método do inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*, fornecedor, risco e medida de controle associados.**

Reagentes	Fornecedor/%Pureza	Risco Significativo	Medida de Controle
di- <i>n</i> -hexil ftalato (padrão interno)	Chemicals Prolabo/ 99,9 %	Pode causar danos a recém-nascidos, possível risco de comprometer a fertilidade	Usar luvas de nitrilo. Não realizar este teste se estiver grávida
deltametrina (princípio ativo)	Detrans 2649 A/ 10,1 %	Irritante	Usar luvas de nitrilo. Óculos
acetona (solvente)	A Johnson Matthey Company /98%	Inflamável, Irritante	Usar óculos e luvas de nitrilo. Manter afastado de fontes de calor

À deltametrina utilizada está associado o número de CAS 52918-63-5 e a sua composição é a seguinte:

- ✓ deltametrina - 10,1 %
- ✓ acetato de 1-metil-2-metoxietilo - 52,14 %
- ✓ destilados (petróleo), leves tratados com hidrogénio - 37,76 %

O material de laboratório utilizado para a implementação do método e os seus respetivos erros associados, são indicados de seguida:

- ✓ gobelés - 250 mL
- ✓ balão volumétrico -  $100 \pm 0,10$  mL
- ✓ balão volumétrico -  $50 \pm 0,06$  mL
- ✓ pipeta volumétrica -  $10 \pm 0,04$  mL
- ✓ pipeta volumétrica -  $5 \pm 0,015$  mL
- ✓ pipeta de Pasteur

Para a implementação do método foram utilizados três tipos de equipamentos diferentes. Uma balança analítica, onde eram pesadas os inseticidas e os princípios ativos, uma unidade de ultrasons, onde as soluções eram homogeneizadas e o cromatógrafo gasoso com o detetor FID onde eram efetuadas as análises para a quantificação do princípio ativo.

A balança analítica usada (marca Mettler Toledo, modelo AG 204 Delta range) possuía, uma capacidade máxima de 814 g e uma precisão de 0,1 mg.

A unidade de ultrasons utilizada era da marca Telsonic Ultrasonics (Telsonic Power Cleaning).

A quantificação da deltametrina neste método foi levada a cabo num cromatógrafo da marca Hewlett Packard HP da série 6890, equipado com um detetor de ionização de chama, um

injetor com divisor de amostra do tipo *split/splitless* e a integração digital dos picos do cromatograma assegurada pelo software *ChemStation*. A coluna utilizada era do tipo capilar, com as dimensões de 30 m×530 µm×1,50 µm. A fase estacionária era do tipo DB-1, ou seja, 100% dimetilpolisiloxano, que é uma fase estacionária apolar com uma larga escala de aplicabilidade, um grande limite de temperaturas suportadas (-60 a 300/320 °C) e possível de ser utilizada numa grande variedade de dimensões de colunas.

Na Figura 6.1 encontra-se uma imagem com o GC-FID utilizado durante a implementação deste método, o computador de aquisição de dados, o sistema de alimentação dos gases e a unidade de ultrassons utilizada na preparação das amostras a analisar.



Figura 6.1 -- Sistema de alimentação dos gases (1); GC-FID (2); Computador como o software *ChemStation* (3); Unidade de ultrassons (4).

### 6.1.2. Condições de operação usadas na análise cromatográfica

As condições de operação usadas inicialmente para a quantificação da deltametrina por cromatografia gasosa foram as indicadas no método que foi fornecido pela COLEP, cujo protocolo se encontra em anexo (Anexo I).

O procedimento experimental descrito no protocolo pressupõe a injeção de 1,5 µL da solução padrão e posteriormente da solução amostra, ambas preparadas com a adição do padrão interno di-n-hexil ftalato, sendo o tempo total de análise de 25 minutos para cada solução. O pico correspondente à deltametrina deveria surgir aos 10,2 minutos e o pico do padrão interno ao fim de 18,6 minutos, tal como está referido no protocolo.

Depois da análise de 10 réplicas da solução padrão e da análise de uma solução amostra, verificou-se que a metodologia descrita no protocolo fornecido pela COLEP teria de ser modificada, pois observou-se a ausência de picos em algumas das análises e, quando existiam, constatou-se que os tempos de retenção não eram reprodutíveis, como se pode verificar pela análise de dois dos cromatogramas obtidos que são apresentados no Anexo II.

Começou-se por passar vapor pela coluna durante 90 minutos para eliminar vestígios de resíduos que pudessem existir de análises efetuadas anteriormente e optou-se por preparar

uma solução contendo apenas o princípio ativo e o solvente para se otimizar as condições de operação de forma a obter tempos de retenção adequados.

A solução contendo apenas o princípio ativo e o solvente foi preparada da seguinte maneira:

#### ✓ Solução deltametrina

Pesar 0,1000 g de deltametrina na balança analítica num balão de 50 mL e completar com acetona. Levar ao equipamento de ultrassons para homogeneizar.

Na Tabela 6.2 está indicado o programa de temperatura usado nos diferentes componentes do cromatógrafo e, na Tabela 6.3 as condições operatórias utilizadas, nomeadamente, os caudais de hidrogénio, hélio e ar reconstituído utilizados, bem como a razão de *split*, usada no injetor.

Tabela 6.2 - Condições de temperatura dos componentes do GC-FID.

<b>Injetor</b>	250 °C
<b>Forno</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Inicial: 165 °C</li><li>• Final: 240 °C</li><li>• Variação: 3 °C/min</li></ul>
<b>Detetor</b>	250 °C

Tabela 6.3 – Algumas condições operatórias utilizadas no GC-FID durante a análise das soluções.

Gás	Caudal (mL/min)	Local do GC	Outras condições	
Hélio	61,30	Injetor	<i>Split ratio</i>	0,900
Hidrogénio	40,00	Detetor	<i>Split flow</i>	28,4
Ar reconstituído	450,0	Detetor	Sensibilidade	20,0

Foram preparadas 9 soluções de deltametrina diferentes usando o procedimento descrito anteriormente e após injeção verificou-se que a não reprodutibilidade dos tempos de retenção para os picos da deltametrina se continuava a verificar, tal como se pode observar no Anexo III. Sendo assim, resolveu-se modificar as condições de operação usadas no GC-FID e alterar o tempo de análise para 1 hora até se verificar a reprodutibilidade dos tempos de retenção dos picos da deltametrina. Após se estabelecer as condições de operação foi necessário adequar o tempo de análise, pois 1 hora seria tempo excessivo para uma análise de controlo de qualidade na COLEP, tendo-se modificado a rampa de temperaturas.

As novas condições de operação utilizadas nas análises cromatográficas encontram-se representadas na Tabela 6.4 e Tabela 6.5, onde estão indicados os programas de temperatura usados nos diferentes componentes do cromatógrafo e os caudais de hidrogénio, hélio e ar reconstituído utilizados, bem como outras condições importantes, como por exemplo, a razão de *split*, usada no injetor. O novo tempo de análise conseguido com as novas condições de operação otimizadas passou a ser de 31 minutos.

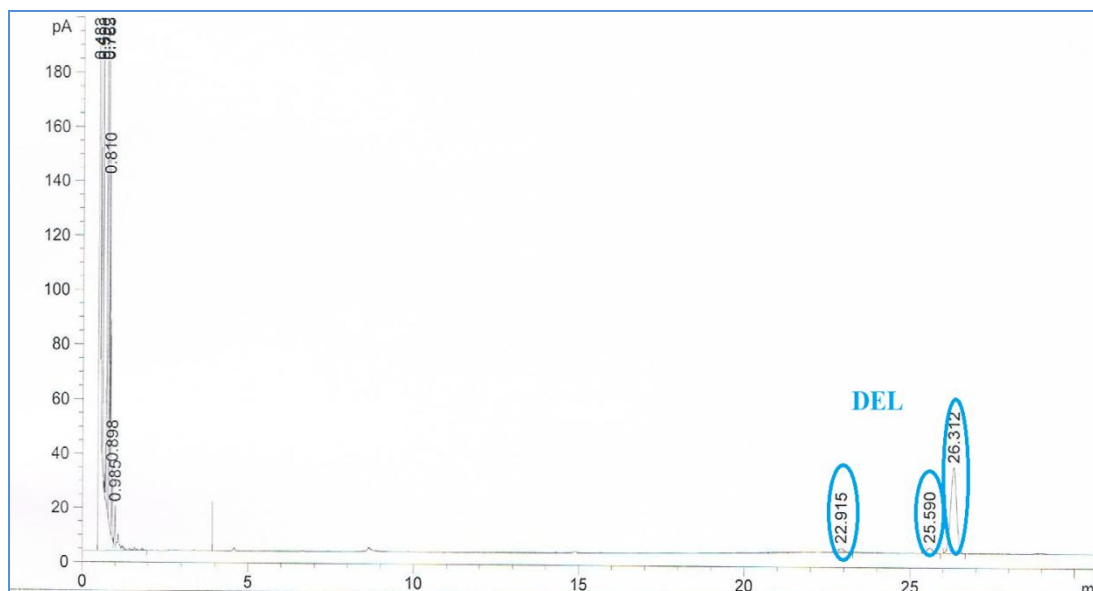
**Tabela 6.4 - Condições de temperatura dos componentes do GC-FID.**

<b>Injetor</b>	250 °C
<b>Forno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inicial: 165 °C mantendo-se por 1 min</li> <li>• Final: 265 °C mantendo-se por 10 min</li> <li>• Variação: 5 °C/min</li> </ul>
<b>Detetor</b>	250 °C

**Tabela 6.5 - Algumas condições operatórias utilizadas no GC-FID durante a análise das soluções.**

Gás	Caudal (mL/min)	Local do GC	Outras condições	
Hélio	61,30	Injetor	<i>Split ratio</i>	20,0
Hidrogénio	40,00	Detetor	<i>Split flow</i>	28,4
Ar reconstituído	450,0	Detetor	Sensibilidade	5,00

No cromatograma apresentado na Figura 6.2 estão assinalados os picos da deltametrina para as novas condições de operação.



**Figura 6.2 – Cromatograma da solução da deltametrina para o tempo de análise de 31 minutos.**

Como já foi referido anteriormente, nos métodos *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals* o princípio ativo é a deltametrina, que possui 8 estereoisómeros na sua fórmula, podendo assim surgir no cromatograma até 8 picos correspondentes a esta substância. Analisando a imagem anterior verifica-se a existência de 3 picos com tempos de retenção relativamente próximos. Ora, como a molécula da deltametrina contém bromo na sua constituição, para o qual o detetor utilizado (FID) possui sensibilidade baixa, é, por isso, aceitável que não apareçam picos individualizados para todos os estereoisómeros da deltametrina. Pela análise dos cromatogramas da solução deltametrina (ver Figura 6.2) também se pode verificar que no início da análise eluem bastantes substâncias com tempos de retenção muito próximos, quando apenas seria de se esperar que surgisse o pico relativo ao solvente (acetona). Isto

acontece porque a deltametrina utilizada tem uma pureza baixa (10,1%), sendo esses picos correspondentes aos compostos que constituem as impurezas da deltametrina utilizada. Como a fase estacionária utilizada na coluna cromatográfica é apolar os compostos a eluir em último lugar são os mais apolares, uma vez que têm maior afinidade com a fase estacionária, pelo que, sendo a molécula de deltametrina apolar (ou muito pouco polar) o primeiro pico que elui do conjunto de picos correspondente à deltametrina será do seu estereoisômero mais polar.

### 6.1.3. Determinação da percentagem de princípio ativo no método desenvolvido para o inseticida *Sinclair*

As soluções preparadas para a determinação da deltametrina no método do inseticida *Sinclair* são as mesmas que estão no protocolo fornecido pela COLEP e que se encontra em anexo (Anexo I).

Com as condições de operação indicadas na Tabela 6.4 e na Tabela 6.5 procedeu-se à injeção da solução padrão, e de seguida da solução amostra.

Um exemplo dos cromatogramas registados durante a análise, está representado na Figura 6.3.

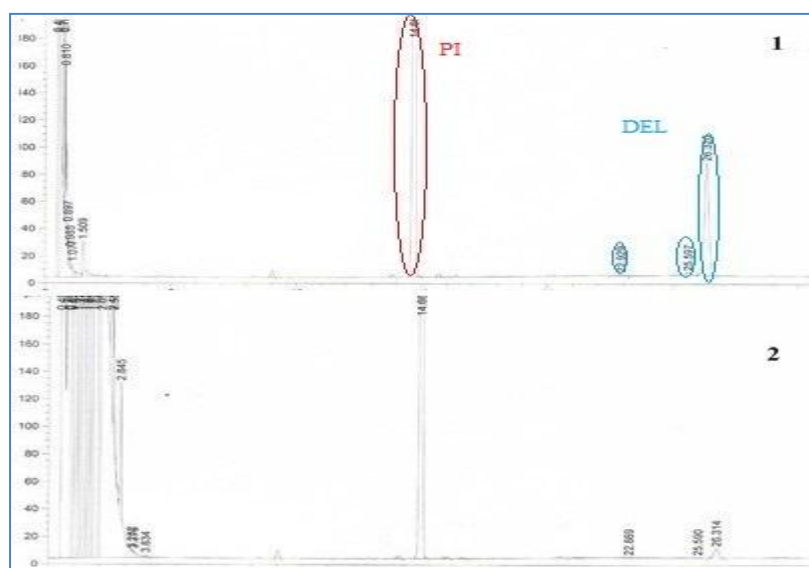


Figura 6.3 – (1) Cromatograma obtido na análise da solução padrão do inseticida *Sinclair*; (2) – Cromatograma obtido na análise da solução amostra do inseticida *Sinclair*.

Foram realizados 10 ensaios com réplicas da solução padrão e solução amostra. Na Tabela 6.6 encontram-se as massas da deltametrina e de inseticida usadas na preparação das 10 réplicas das soluções padrão e amostra e as respetivas áreas obtidas a partir da integração dos picos do cromatogramas para o padrão interno (ISTD) e para a deltametrina, sendo para esta última o valor correspondente à soma das áreas dos três picos obtidos para os seus estereoisômeros.

**Tabela 6.6 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra, e respectivas áreas dos picos da deltametrina e padrão interno nos 10 ensaios efetuados.**

Ensaio	m (deltametrina) (g)	m (inseticida) (g)	Solução Padrão		Solução Amostra	
			Área ISTD	Área DEL	Área ISTD	Área DEL
1	0,1028	23,0057	2627,99	418,79	4144,11	336,13
2	0,1040	23,0150	2487,92	409,86	4031,28	322,66
3	0,1087	23,0168	2621,59	465,48	4754,64	382,27
4	0,1048	23,0250	2500,55	404,10	4292,76	367,58
5	0,1035	23,0423	2591,35	451,48	4655,24	383,84
6	0,1083	23,7111	2693,85	477,63	4645,46	403,47
7	0,1154	23,0027	2878,93	526,99	4577,21	376,21
8	0,1024	23,0033	3182,18	475,87	4689,54	394,11
9	0,1177	23,2036	2719,07	524,25	4718,15	398,23
10	0,1047	23,0244	2862,17	496,33	4689,96	388,95

Com a informação da tabela anterior e usando a equação 5.9 foi calculada a percentagem da deltametrina no inseticida, e verificou-se que os valores não se encontravam dentro das especificações do cliente (0,0316 %-0,035 %) para a formulação do inseticida que foi preparada. Foi, então, necessário melhorar a metodologia e, realizaram-se vários testes alterando as condições de operação do GC-FID e as quantidades do analito usadas na preparação das soluções padrão e soluções amostra.

Após vários testes, a percentagem da deltametrina obtida para a formulação do inseticida cedida pelo cliente, ou preparada de acordo com as diretivas do cliente, correspondia aos valores das especificações do cliente. As características da solução padrão e solução amostra depois de otimizadas são apresentadas de seguida, assim como a descrição da preparação de todas as outras soluções necessárias.

#### ✓ Solução Padrão Interno

Num gobelé de 100 mL, pesar 1,0000 g de di-n-hexil ftalato na balança analítica e 99,0000 g de acetona. Agitar a solução.

#### ✓ Solução Padrão

Pesar 0,1000 g de deltametrina na balança analítica para um balão volumétrico de 50 mL e pipetar 5 mL da solução padrão interno preparada anteriormente e completar com acetona. Levar a solução à unidade de ultrassons por 5 minutos.

#### ✓ Solução Amostra 1

Pesar 28,0000 g de inseticida na balança analítica para um balão de 100 mL e completar com acetona. Agitar a solução.

### ✓ Solução Amostra Final

Pipetra 10 mL da solução amostra 1 preparada anteriormente para um balão volumétrico de 50 mL. Pipetar 5 mL da solução padrão interno e completar com acetona. Levar a solução à unidade de ultrassons por 5 minutos.

As condições do cromatógrafo também foram otimizadas, alterando algumas condições, que estão representadas na Tabela 6.7, mas mantendo os programas de temperatura indicados na Tabela 6.4,. O tempo de análise para cada solução foi mantido, continuando a ser de 31 minutos.

**Tabela 6.7 - Condições de temperatura dos componentes do GC-FID.**

Gás	Caudal (mL/min)	Local do GC	Outras condições	
Hélio	45,30	Injetor	<i>Split ratio</i>	1,80
Hidrogénio	45,00	Detetor	<i>Split Flow</i>	27,6
Ar reconstituído	248,0	Detetor	Sensibilidade	2,00

Depois de se realizar 10 ensaios de diferentes soluções padrão e 10 ensaios com diferentes soluções amostra, obtiveram-se os seguintes resultados das áreas dos picos cromatográficos registados na Tabela 6.8.

**Tabela 6.8 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra, e respetivas áreas dos picos da deltametrina e padrão interno nos 10 ensaios efetuados.**

Ensaio	m (deltametrina)	m (inseticida)	Solução Padrão		Solução Amostra	
	(g)	(g)	Área ISTD	Área DEL	Área ISTD	Área DEL
1	0,1003	28,0057	5666,31	1056,38	5652,09	97,79
2	0,1085	28,0128	5935,24	1145,30	5721,60	91,03
3	0,1000	28,0157	5697,60	1044,21	5513,07	93,26
4	0,1118	28,0228	5805,43	1143,66	5870,03	93,86
5	0,1033	28,0164	5558,87	1084,47	5755,11	97,86
6	0,1014	28,0225	5334,27	1024,99	4892,78	88,04
7	0,1017	29,0454	4789,12	1018,43	4941,65	93,85
8	0,1019	28,0122	4869,53	1018,44	5069,03	91,51
9	0,1043	28,2307	5622,93	1089,40	5592,38	99,81
10	0,1034	28,2015	5823,19	1087,69	5755,11	97,86

A partir dos resultados da análise os valores da percentagem da deltametrina foram determinados e verificou-se que os teores do princípio ativo encontravam-se dentro das especificações requeridas pelo cliente, pelo que se considerou que o método estava desenvolvido. A percentagem da deltametrina no inseticida *Sinclair* obtida utilizando a



equação 5.10 nos 10 ensaios, assim como a média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ) encontram-se na Tabela 6.9.

**Tabela 6.9 – Resultados obtidos da percentagem de deltametrina nos 10 ensaios realizados, média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ) no método desenvolvido para o inseticida do cliente *Sinclair*.**

<i>Sinclair</i>	
Ensaio	% DEL
1	0,0336
2	0,0323
3	0,0333
4	0,0327
5	0,0325
6	0,0340
7	0,0316
8	0,0317
9	0,0344
10	0,0337
$\bar{x}$	0,0330
$\sigma$	0,00096

Analisando a tabela anterior verifica-se que a média dos valores da percentagem de deltametrina obtidos no desenvolvimento do método do inseticida *Sinclair* encontra-se dentro dos valores fornecidos pelo cliente (0,0316 %-0,0350 %). No que diz respeito ao desvio padrão, este como medida de dispersão individual mostra que os valores obtidos estão próximos da média.

#### **6.1.4. Determinação da Percentagem do Ativo no Método Desenvolvido para o Inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals***

No método utilizado para a determinação do princípio ativo no inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals* foram utilizados os mesmos equipamentos e os mesmos reagentes que no método apresentado anteriormente para o inseticida *Sinclair*, uma vez que a deltametrina usada na formulação de ambos os inseticidas teve a mesma origem. Assim, as condições de operação usadas na análise cromatográfica foram as mesmas, tendo sido, apenas, necessário verificar quais as concentrações mais adequadas a usar na preparação da solução padrão e da solução amostra.

Numa primeira fase, prepararam-se as soluções padrão e soluções amostra seguindo o procedimento já descrito para o método *Sinclair* desenvolvido. No entanto, após alguns ensaios as concentrações das soluções preparadas revelaram-se não ser as mais adequadas,



Execução Experimental e Discussão de Resultados  
pelo que se procedeu à sua otimização até chegar ao modo de preparação apresentado de seguida.

### ✓ Solução Padrão Interno

Num gobelé de 100 mL pesar 1,0000 g de di-n-hexil ftalato na balança analítica e 99,0000 g de acetona. Agitar a solução.

### ✓ Solução Padrão

Pesar 0,1000 g de deltametrina na balança analítica para um balão volumétrico de 50 mL. Pipetar 5 mL da solução padrão-interno preparada anteriormente e completar com acetona. Levar a solução à unidade de ultrassons por 5 minutos.

### ✓ Solução Amostra

Pesar 15,0000 g de inseticida na balança analítica para um balão de 50 mL, pipetar 5 mL da solução padrão interno preparada anteriormente e completar com acetona. Levar a solução à unidade de ultrassons.

Na Figura 6.4 apresenta-se o registo do cromatograma obtido na análise de uma das 10 réplicas da solução amostra preparadas, onde estão assinalados os 3 picos correspondentes aos estereoisómeros da deltametrina (azul), assim como o pico que representa o padrão-interno usado (vermelho).

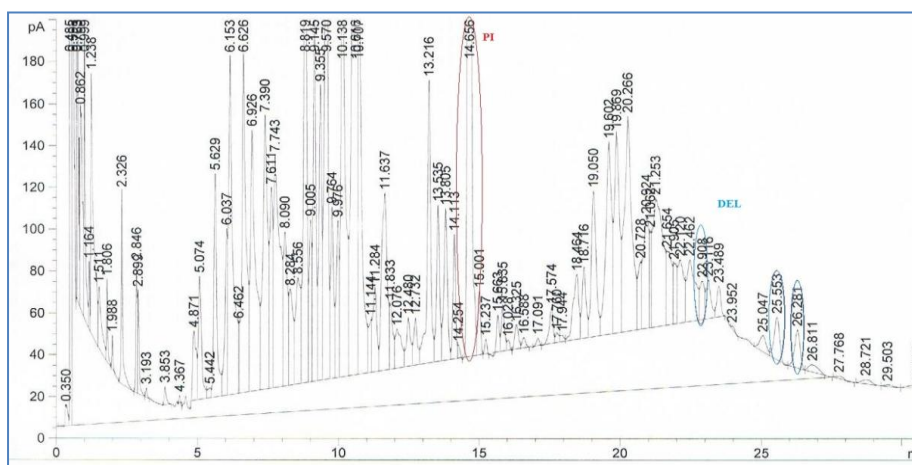


Figura 6.4 – Cromatograma obtido na análise da solução amostra do inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*.

Os resultados das análises das 10 réplicas de solução padrão e solução amostra, assim como as massas usadas na sua preparação encontram-se registados na Tabela 6.10.

**Tabela 6.10 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra, e respectivas áreas dos picos da deltametrina e padrão interno nos 10 ensaios efetuados.**

Ensaio	m (deltametrina) (g)	m (inseticida) (g)	Solução Padrão		Solução Amostra	
			Área	Área	Área	Área
			ISTD	DEL	ISTD	DEL
1	0,1000	15,0076	5697,60	1044,21	7194,23	532,28
2	0,1003	15,0059	5666,31	1056,38	8472,13	726,98
3	0,1085	15,0089	5935,24	1145,30	7330,68	574,47
4	0,1033	15,0104	5558,87	1084,47	8521,13	746,13
5	0,1014	15,0122	5334,27	1024,99	8250,09	723,40
6	0,1019	15,0107	4869,53	1018,44	6529,15	593,98
7	0,1017	15,0789	4789,12	1018,43	7638,49	741,37
8	0,1043	15,0237	5622,93	1089,40	6881,70	614,71
9	0,1034	15,0133	5823,19	1087,69	6228,58	582,84
10	0,1118	15,0032	5805,43	1143,66	6751,80	697,00

A percentagem da deltametrina nas diversas réplicas da solução amostra preparadas foi calculada e verificou-se que, em geral, os valores se encontravam dentro das especificações requeridas pelo cliente, pelo que se admitiu que o método desenvolvido era adequado.

Na Tabela 6.11 encontram-se os valores calculados da percentagem de deltametrina, assim como a média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ) no inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*.

**Tabela 6.11 – Resultados obtidos da percentagem de deltametrina nos 10 ensaios realizados, média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ) no método desenvolvido para o inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*.**

<i>Gerhardt Pharmaceuticals</i>	
Ensaio	% DEL
1	0,0272
2	0,0311
3	0,0297
4	0,0312
5	0,0311
6	0,0298
7	0,0311
8	0,0323
9	0,0348
10	0,0394
$\bar{x}$	0,0318
$\sigma$	0,0033

Analisando a tabela anterior verifica-se que a média dos valores da percentagem de deltametrina obtidos no desenvolvimento do método do inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals* encontra-se ligeiramente superior à especificação requerida pelo cliente (0,0257 %-0,0315 %). O desvio padrão é maior quando comparado com o obtido no método desenvolvido para o cliente *Sinclair*, mostrando assim que existe uma maior dispersão de valores, o que seria de esperar tendo em conta os resultados obtidos.

#### 6.1.5. Validação do Método *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*

Para a validação de um método é necessário proceder-se à determinação de vários parâmetros como já foi referido no capítulo 5. Alguns desses parâmetros são obtidos a partir da determinação de uma reta de calibração para o princípio ativo usado nos métodos desenvolvidos para os inseticidas *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*. Sendo assim, foram preparadas, em triplicado, soluções padrão com diferentes massas de deltametrina. Os resultados para as áreas do princípio ativo e padrão interno obtidos da análise das soluções padrão preparadas, e, a razão das áreas, ( $\frac{A_{ativo}}{A_{ISTD}}$ ), encontram-se registados na Tabela 6.12.

Tabela 6.12 – Massas usadas na preparação das soluções padrão, e respetivas áreas dos picos da deltametrina e padrão interno obtidos da sua análise cromatográfica, e respetiva razão das áreas.

m (deltametrina) (g)	Triplicado	A (DEL)	A(ISTD)	$\frac{A_{ativo}}{A_{ISTD}}$
0,1000	1	1145,30	5935,24	0,190
	2	1056,38	5666,31	0,190
	3	1044,21	5697,60	0,180
0,2016	1	2302,23	5148,13	0,450
	2	2253,44	4995,49	0,450
	3	2303,44	5186,23	0,440
0,3075	1	3207,10	5554,65	0,580
	2	3380,04	5713,16	0,590
	3	3440,74	5652,64	0,610
0,4053	1	4424,09	5647,32	0,780
	2	4425,16	5846,88	0,760
	3	4502,25	5383,18	0,840
0,5042	1	5377,25	5165,86	1,04
	2	5698,61	5932,67	0,960
	3	5439,68	5265,58	1,03

Para a análise do intervalo de trabalho seria necessário realizar 10 réplicas independentes da solução padrão menos concentrada e 10 réplicas independentes da solução mais concentrada, tal como foi referido anteriormente, mas como apenas foram feitas 3 réplicas

para cada uma das duas soluções padrão, o intervalo de trabalho foi calculado para estas condições e tentar-se-á retirar as conclusões possíveis.

Na tabela seguinte encontram-se os valores das variâncias calculados para as duas soluções em análise, o respetivo valor de  $PG$ , calculado usando a equação 5.11 e o valor de  $F$  tabelado para um nível de significância de 5% (ver tabela Anexo IV) (Fernandes, 1999).

**Tabela 6.13 – Valores obtidos no cálculo das variâncias,  $PG$  e  $F_{tab}$  para as soluções padrão menos concentrada e mais concentrada.**

Solução padrão	$S^2$	$PG$	$F_{tab}$
menos concentrada	2,44E-05	80,33	19,00
mais concentrada	1,96E-03		

Como se pode observar o valor de  $PG$  é cerca de quatro vezes superior ao valor de  $F$  obtido da tabela de *Snedecor//Fisher* para 2 grau de liberdade no numerador e 2 graus de liberdade no denominador, o que se poderá dever ao facto de se ter usado 3 réplicas e não 10 réplicas independentes de cada uma das soluções padrão preparadas. Apesar de, de acordo com os resultados, a gama de trabalho dever ser reduzida, optou-se por não valorizar estes resultados, pois pode dever-se apenas ao facto de o número de réplicas usadas não ser suficiente.

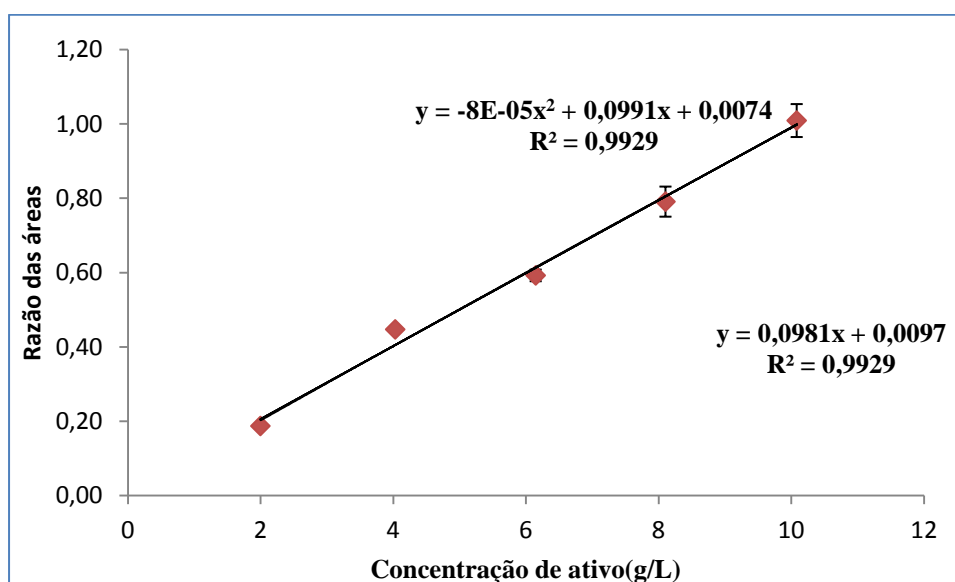
Para a determinação da linearidade é necessário ajustar-se o conjunto de resultados experimentais, traduzidos pela razão das áreas,  $\frac{A_{ativo}}{A_{ISTD}}$ , indicadas na Tabela 6.12 a duas funções de calibração; uma função linear do 1º grau e a uma outra função traduzida por um polinómio do 2º grau.

Para isso, foi calculada a média das áreas dos picos correspondentes à deltametrina e ao padrão interno nos triplicados, assim como a razão das áreas correspondente a cada uma das soluções padrão preparadas com concentrações de deltametrina diferentes, e os valores obtidos encontram-se registados na Tabela 6.14.

**Tabela 6.14 – Concentração (média) de deltametrina nas soluções padrão preparadas, média das áreas da deltametrina e do padrão interno e correspondente razão das áreas média.**

Concentração de deltametrina (g/L)	Média Área DEL	Média Área ISTD	$\frac{A_{ativo}}{A_{ISTD}}$
2,00	1081,96	5766,38	0,190
4,00	2286,37	5109,95	0,450
6,00	3342,62	5640,15	0,590
8,00	4450,50	5625,79	0,790
10,00	5505,18	5454,70	1,01

Na Figura 6.5 estão representadas as curvas de calibração ajustadas aos resultados obtidos da análise das soluções padrão, usando uma função linear (do 1º grau) e um polinómio do 2º grau.



**Figura 6.5 – Reta de calibração do princípio ativo.**

Verifica-se que as duas funções de ajuste usadas originaram curvas de calibração sobreponíveis, indicando que na gama de concentrações usadas existe uma relação linear entre o fator de resposta e a concentração do analito. Para confirmar procedeu-se, ainda, ao cálculo do valor de  $PG$ .

Deu-se início ao processo de cálculo, determinando o desvio padrão da função calibração linear ( $S_{x/y}$ ) e o desvio padrão da função calibração não linear ( $S_{y2}$ ), usando as equações seguintes:

$$S_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - (a + bx_i))^2}{N - 2}} \quad \text{Eq. 6.1}$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - (c + dx_i + ex_i^2))^2}{N - 3}} \quad \text{Eq. 6.2}$$

onde  $a$  e  $b$  são os parâmetros da função linear,  $x_i$  traduz as concentrações do princípio ativo nas soluções padrão,  $y_i$  traduz os fatores de resposta associados a  $x_i$ ,  $N$  é o número de padrões de calibração usados e os parâmetros  $c$ ,  $d$  e  $e$  são os coeficientes do polinômio de 2ª ordem.

Os valores obtidos para  $(S_{x/y})$ ,  $(S_{y2})$ , o valor da diferença das variâncias ( $DS^2$ ) calculado segundo a equação 5.13, o valor de  $PG$  calculado segundo a equação 5.14, e o valor de  $F_{tab}$  para um grau de significância de 5 % (Fernandes, 1999) encontram-se indicados na Tabela 6.15.

**Tabela 6.15 – Valores obtidos do desvio padrão da função linear ( $S_{x/y}$ ), do desvio padrão da função não linear ( $S_{y2}$ ), da diferença de variâncias ( $DS^2$ ), de  $PG$  e valor de  $F$  tabelado para a determinação da linearidade da função calibração.**

$S_{x/y}$	$S_{y2}$	$DS^2$	$PG$	$F_{tab}$
0,03069	0,03758	1,399E-06	0,0009906	18,51

O valor de  $PG$  obtido é menor que o valor de  $F$  da Tabela de Snedecor / Fisher, para  $N-3$  graus de liberdade para  $S_{y2}^2$ , e 1 grau de liberdade para  $DS^2$  (Ferreira, 2010), para um grau de significância de 5%, o que demonstra então que a função calibração é descrita como uma função linear do primeiro grau, como já se tinha verificado com a representação gráfica das curvas de calibração ajustadas aos resultados obtidos da análise das soluções padrão, para uma função linear (do 1º grau) e para um polinômio do 2º grau.

Determinando-se que a reta de calibração segue uma função linear pode-se proceder ao cálculo do limite de detecção ( $L.D$ ) e do limite de quantificação ( $L.Q$ ), através das equações 5.16 e 5.19 respetivamente, estando os valores obtidos apresentados na Tabela 6.16.

**Tabela 6.16 – Limite de detecção ( $L.D$ ) e limite de quantificação ( $L.Q$ ) do método de análise dos inseticidas *Sinclair e Gerhardt Pharmaceuticals*.**

$L.D$ (g/L)	$L.Q$ (g/L)
1,03	3,13

Pode-se verificar então que a deltametrina é detetada para concentrações na solução amostra iguais ou superiores a 1,03 g/L. No que diz respeito ao limite de quantificação do método analítico este é de 3,13 g/L, o que significa que para se obter uma boa exatidão e precisão, seria necessário esta concentração de analito.

É de referir que a concentração de princípio ativo na solução padrão, de acordo com o procedimento descrito anteriormente é de  $0,1000 \text{ g} \times 0,101/0,05000 \text{ L} = 0,2020 \text{ g/L}$  que é inferior ao limite de detecção, o que não se afigura adequado. No entanto, conforme se referiu

anteriormente, esta limitação pode ficar a dever-se ao facto de se ter utilizado apenas 3 e não 10 réplicas, como se encontra previsto no Guia de Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química (Relacre, 2010).

Como já foi referido no Capítulo 5, a precisão é condicionada pela existência de erros aleatórios, que se admite que seguem uma distribuição normal ou de Gauss.

Para verificar se os erros associados à determinação da percentagem de deltametrina num inseticida seguem uma distribuição normal (ou distribuição de Gauss) foi usado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*, cujo resultado se passa a apresentar na Tabela 6.18, onde se encontram representados os valores do  $D_{exp}$  calculado através da equação 5.23 e o valor de  $D_{tab}$ , sendo este último retirado das tabelas de *Kolmogorov-Smirnov* para 10 ensaios e um nível de significância de 5% (ver tabela Anexo V)(Câmara e Silva, 2001).

**Tabela 6.17 – Valores de  $D_{exp}$  e de  $D_{tab}$  para os métodos do inseticida *Sinclair* e inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals* para aplicação ao teste de Kolmogorov-Smirnov.**

Inseticida	$D_{exp}$	$D_{tab}$
<i>Sinclair</i>	0,1352	0,410
<i>Gerhardt Pharmaceuticals</i>	0,2686	

Comparando o valor máximo de  $D_{exp}$  obtido é possível concluir-se que as distribuições de frequências observada para a percentagem de deltametrina seguem uma distribuição normal. Ora, como  $D_{exp}$  obtido para os ensaios realizados durante o desenvolvimento do método do inseticida *Sinclair* é de 0,1352 e o valor correspondente ao método do inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals* é de 0,2686, ambos inferiores ao valor de  $D_{tab}$ , é possível concluir que os resultados obtidos experimentalmente seguem uma distribuição normal.

Tendo em conta o número de vezes que a percentagem de deltametrina calculada se encontra dentro de uma determinada classe de valores para os diferentes ensaios realizados em condições idênticas, é possível obter a distribuição de frequências observada e compará-la com a distribuição normal teórica para a variável. Usou-se o *software* de estatística SPSS para comparar as duas distribuições e na Figura 6.8 e Figura 6.9 encontram-se os gráficos obtidos da distribuição observada conjuntamente com a distribuição teórica de Gauss para a variável em causa, para cada um dos inseticidas (*Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*), assim como o estudo comportamental dos resultados obtidos para a percentagem de deltametrina.

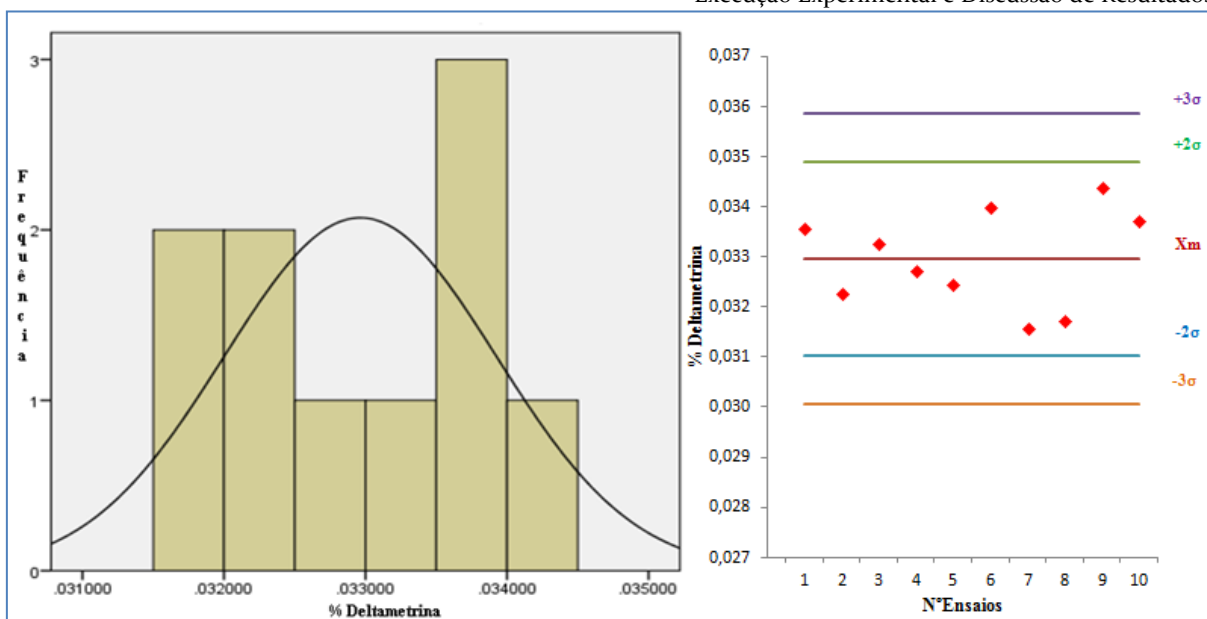


Figura 6.6 – Gráfico da distribuição observada e da distribuição teórica de Gauss para a percentagem de deltametrina calculada no desenvolvimento do método do inseticida *Sinclair* (esq.) – Gráfico do estudo comportamental dos resultados obtidos. (dir.).

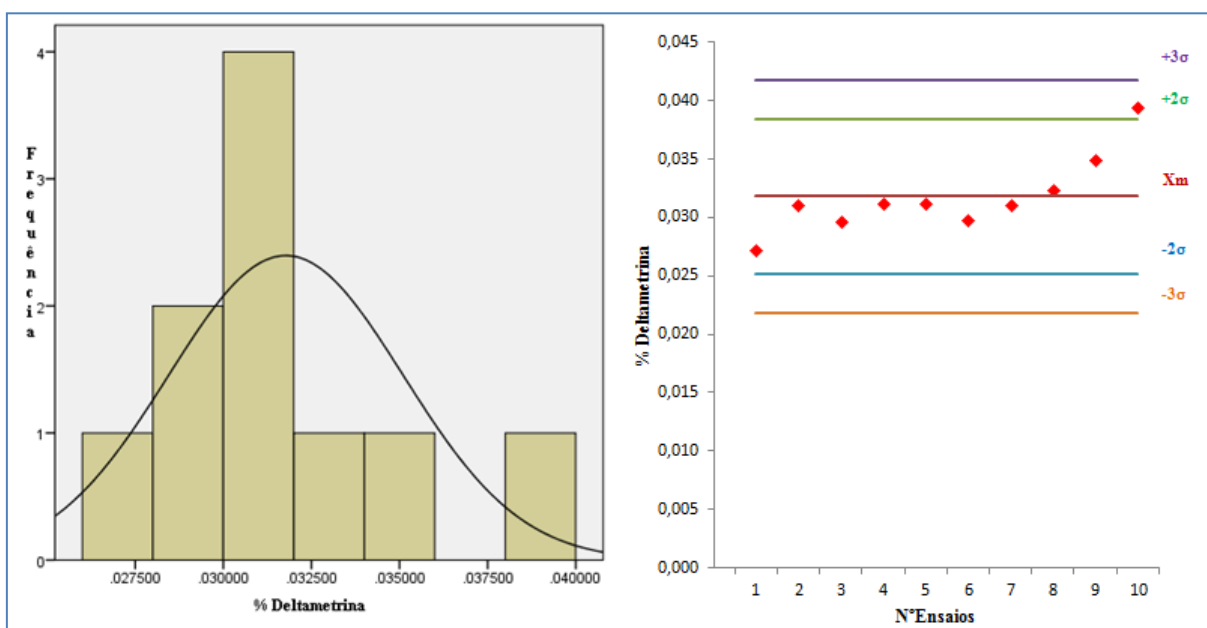


Figura 6.7 - Gráfico da distribuição observada e da distribuição teórica de Gauss para o percentagem de deltametrina calculada no desenvolvimento do método do inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals* (esq.) – Gráfico do estudo comportamental dos resultados obtidos. (dir.).

A partir da análise dos gráficos do lado esquerdo das Figuras 6.8 e 6.9 onde o histograma simboliza a distribuição observada e a curva a distribuição teórica de Gauss, verifica-se que para o método desenvolvido para o inseticida do cliente *Sinclair* na curva da distribuição teórica o valor com maior frequência relativa corresponde ao valor da média da percentagem de deltametrina obtida experimentalmente (0,0330%), o mesmo não acontece quando se analisa o histograma, verificando-se que o valor com maior frequência corresponde o intervalo de valores entre os 0,0335 e 0,0340 % de deltametrina obtida experimentalmente.



Quando analisado o gráfico obtido para o inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals* verifica-se que o intervalo de valores da distribuição observada que correspondem a uma maior frequência correspondem a 0,0300 e 0,0325 % de deltametrina, sendo que neste caso coincide com o valor teórico obtido pelo gráfico da distribuição teórica como sendo o de maior frequência (0,0318 %). No que diz respeito à curva teórica obtida para ambos os inseticidas, verifica-se que a curva correspondente ao inseticida *Sinclair* apresenta menor dispersão em torno da média do que a que se obteve para o inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*, pelo facto do desvio padrão ser inferior para o inseticida *Sinclair* quando comparado com inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*.

Da análise dos gráficos do lado direito das Figuras 6.8 e 6.9 pode-se verificar que os resultados experimentais obtidos para o método do inseticida *Sinclair* (símbolos representados a vermelho) encontram-se dispersos em relação à média ( $X_m$ ), mas, no entanto, não ultrapassam as linhas horizontais que traduzem os limites do valor médio mais ou menos duas vezes o valor do desvio padrão, mostrando assim que os resultados experimentais são aceitáveis. No que diz respeito aos resultados obtidos para o método do inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals* existe uma determinação da percentagem de deltametrina superior ao valor da média mais duas vezes o desvio padrão, mostrando assim uma maior dispersão dos valores do que o verificado no método do inseticida *Sinclair*, o que aliás já tinha sido referido aquando da apresentação do valor do desvio padrão obtido para os dois métodos.

Na Tabela 6.19 encontram-se indicados os valores de mais três parâmetros que traduzem a precisão dos resultados obtidos nos ensaios realizados durante o desenvolvimento dos dois métodos: a variância ( $S^2$ ), desvio padrão médio ( $\sigma_m$ ) e a constante de variância (CV).

**Tabela 6.18 – Variância, desvio padrão médio e coeficiente de variância da fração de deltametrina na solução amostra, calculados para os ensaios realizados durante o desenvolvimento do método *Sinclair* e do método *Gerhardt Pharmaceuticals*.**

Inseticida	$S^2$	$\sigma_m$	CV
<i>Sinclair</i>	9,273E-07	0,0003045 %	2,921%
<i>Gerhardt Pharmaceuticals</i>	1,108E-05	0,001105 %	10,48%

Sendo o desvio padrão médio uma medida de precisão de um conjunto de valores, contendo os erros aleatórios, pode-se representar o valor da percentagem de deltametrina no inseticida do cliente *Sinclair* obtido nos ensaios efetuados como sendo (0,0330±0,0003045)% e o valor da percentagem de deltametrina no inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals* como (0,0318±0,001105)%. Para este último o valor máximo da percentagem de deltametrina é de 0,0328 e o seu mínimo de 0,0307, estando assim o mínimo dentro das especificações indicadas pelo cliente para a percentagem de princípio ativo no inseticida. A variância apresenta um valor baixo para os dois métodos desenvolvidos, sendo, no entanto, maior para o método do inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals* mostrando assim mais uma vez que os valores, em geral, estão mais próximos da média para o método do inseticida *Sinclair* do que para o método do inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*. O valor do coeficiente de variância é de 2,920 % para as determinações da deltametrina no método do inseticida *Sinclair*,

significando que, em média, os desvios relativamente ao valor médio são de 2,920 %, já no método do inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals* a média dos desvios relativamente à média são superiores e iguais a 10,48 %, ainda assim inferiores ao valor de 20%, considerado como o valor aceitável em métodos que contenham impurezas, como é o caso.

Todos os parâmetros apresentados sugerem que a determinação da percentagem de deltametrina para o inseticida do cliente *Sinclair* é mais precisa do que a obtida com o método desenvolvido para o inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*.

No desenvolvimento de um método também é importante analisar-se a exatidão dos resultados obtidos, que é condicionada pela existência de erros sistemáticos. Para a determinação da exatidão seria necessário o recurso a MRC (materiais de referência certificados). Para o efeito, considerou-se o inseticida fornecido pelo cliente como o material de referência, tendo-se admitido, que o valor considerado verdadeiro para a percentagem de deltametrina em ambos os inseticidas, seria o valor fornecido pelo cliente para a formulação do inseticida. Como o cliente forneceu uma pequena gama de valores em que se encontrará o valor considerado verdadeiro da percentagem de deltametrina, considerou-se o valor intermédio do intervalo para os cálculos da exatidão.

Na Tabela 6.20 está registado a gama de valores fornecida pelos clientes dos inseticidas *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*, o valor considerado verdadeiro, a média dos valores da percentagem obtidos experimentalmente e o erro relativo ( $Er$ ).

**Tabela 6.19 – Gama de valores para a percentagem de deltametrina fornecida pelos clientes, valor considerado verdadeiro, média obtida dos valores experimentais ( $\bar{x}$ ) e erro relativo ( $Er$ ) para os inseticidas dos clientes *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*.**

Inseticida	Gama de valores	Valor verdadeiro	$\bar{x}$	$Er$
<i>Sinclair</i>	(0,0316-0,035) %	0,0333 %	0,0330 %	1,010 %
<i>Gerhardt Pharmaceuticals</i>	(0,0257-0,0315) %	0,0286 %	0,0318 %	11,10 %

Tal como se pode verificar na Tabela 6.20, no método desenvolvido para o inseticida do cliente *Sinclair* a média dos valores da percentagem de deltametrina obtidos nos diferentes ensaios está muito próxima do valor considerado como verdadeiro, pelo que o erro relativo associado é pequeno. Já para o método desenvolvido para o inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals* o erro relativo é significativo (11,10%) e a média dos valores obtidos nos diferentes ensaios realizados encontra-se acima do valor considerado como verdadeiro

Os erros sistemáticos podem também ser obtidos usando o teste  $t$  da distribuição de *Student*, sendo o valor de  $t$  calculado recorrendo à equação 5.27. Este valor deverá ser comparado com o valor de  $t$  obtido das tabelas de distribuição de *Student* (ver tabela no Anexo VI). Na Tabela 6.21 encontram-se os valores de  $t$  calculado de acordo com a equação 5.27 ( $t_{cal}$ ) e o valor de  $t$  retirado das tabelas ( $t$ ) para ambos os métodos desenvolvidos (Fernandes 1999).

**Tabela 6.20 – Valores obtidos para o  $t_{cal}$  e  $t$  das tabelas de distribuição de *Student* para um grau de significância de 0,5 % para os resultados obtidos no desenvolvimento dos métodos para o inseticida *Sinclair* e inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*.**

Inseticida	$ t_{cal} $	$t$
<i>Sinclair</i>	1,106	2,262
<i>Gerhardt Pharmaceuticals</i>	3,016	2,262

O módulo do valor de  $t_{cal}$  é maior que o valor de  $t$  das tabelas de distribuição de *Student* para os resultados obtidos no método do inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*, mostrando estatisticamente a existência de erros sistemáticos consideráveis. Por outro lado, para o método desenvolvido para o inseticida do cliente *Sinclair*, verifica-se que os ensaios são satisfatórios uma vez que o valor de  $t_{cal}$  é menor que o valor de  $t$  tabelado, evidenciando a não existência de erros sistemáticos significativos.

Para concluir quanto ao desempenho dos métodos desenvolvidos é necessário conhecer o valor de  $Z$ , tal como foi discutido no capítulo 5 e cujo valor é calculado utilizando a equação 5.28. Na Tabela 6.22 encontram-se os valores da incerteza associado a cada um dos MRC dos inseticidas estudados, valor de desempenho ( $Z$ ) e da percentagem de exatidão calculados a partir dos resultados obtidos nos ensaios realizados para cada um dos métodos desenvolvidos.

**Tabela 6.21 – Valores obtidos para o desempenho ( $Z$ ) e exatidão dos resultados obtidos durante o desenvolvimento dos métodos para o inseticida *Sinclair* e inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*.**

Inseticida	$I$	$Z$	Exatidão (%)
<i>Sinclair</i>	0,0017	0,198	98,99
<i>Gerhardt Pharmaceuticals</i>	0,0029	1,10	111,1

O valor de desempenho ( $Z$ ) para ambos os métodos é menor que dois, o que indica que o desempenho é satisfatório. Como já foi referido anteriormente, o valor considerado verdadeiro para a percentagem de deltametrina no inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals* é mais baixo do que a média dos valores obtida experimentalmente e, por isso, a exatidão calculada é de 111,10 %. Já para o método do inseticida *Sinclair* o valor de exatidão é de 98,99 %, o que traduz o facto de o valor considerado verdadeiro ser bastante próximo do valor médio obtido nos ensaios realizados para a quantificação da deltametrina no inseticida.

#### 6.1.6. Estudo da influência da quantidade de princípio ativo na determinação analítica

Com vista a avaliar a influência da concentração de deltametrina da solução padrão usada no cálculo da percentagem deste princípio ativo na solução amostra, realizaram-se experiências para os dois inseticidas *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals* em que se variou a quantidade de deltametrina adicionada na solução padrão.

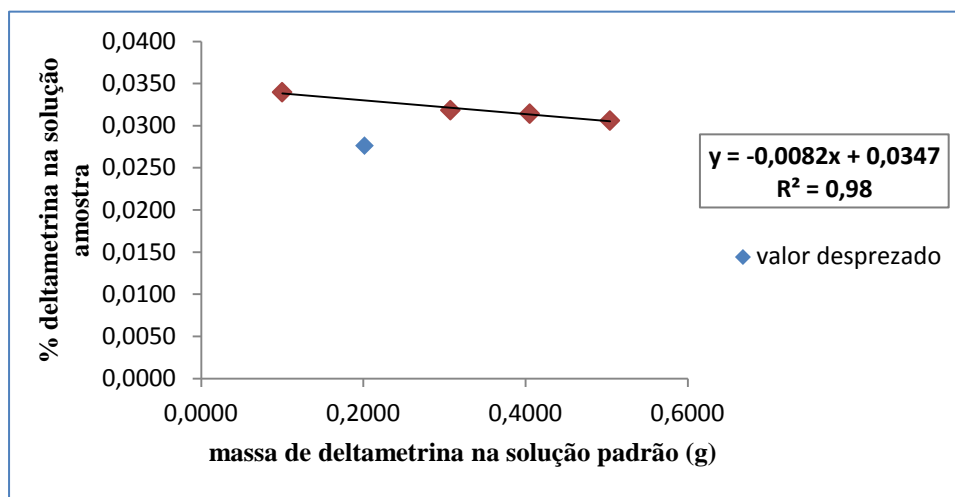
Os resultados obtidos para os triplicados das soluções padrão preparadas com diferentes massas de deltametrina, foram usados para calcular a percentagem de deltametrina numa solução amostra, usando a equação 5.9. Na Tabela 6.17 encontram-se os valores da

percentagem da deltametrina calculados para o inseticida *Sinclair* e para o inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*.

**Tabela 6.22 – Valores de percentagem de deltametrina obtidos na solução amostra para diferentes massas de deltametrina na solução padrão e a respetiva média, para o inseticida *Sinclair* e para o inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*.**

m (deltametrina) g	Inseticida <i>Sinclair</i>				Inseticida <i>Gerhardt Pharmaceuticals</i>			
	%	%	%		%	%	%	
	DEL	DEL	DEL	Média	DEL	DEL	DEL	Média
	(1)	(2)	(3)		(1)	(2)	(3)	
0,1000	0,0345	0,0340	0,0334	0,0340	0,0297	0,0284	0,0288	0,0289
0,2016	0,0276	0,0274	0,0278	0,0276	0,0238	0,0236	0,0239	0,0238
0,3075	0,0326	0,0319	0,0310	0,0318	0,0281	0,0274	0,0266	0,0274
0,4053	0,0317	0,0328	0,0297	0,0314	0,0273	0,0282	0,0256	0,0270
0,5042	0,0297	0,0322	0,0299	0,0306	0,0255	0,0277	0,0257	0,0263

Para facilitar, o valor médio da percentagem de deltametrina calculada para a solução amostra analisada foi representada em função da massa do princípio ativo usado na preparação da solução padrão que serviu de referência para o seu cálculo. Os gráficos obtidos para o inseticida *Sinclair* e para o inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals* encontram-se na Figura 6.6 e Figura 6.7 respetivamente.



**Figura 6.8 - Valores de percentagem de deltametrina calculados para uma solução amostra do inseticida *Sinclair* usando como referência soluções padrão preparadas com diferentes massas de deltametrina.**

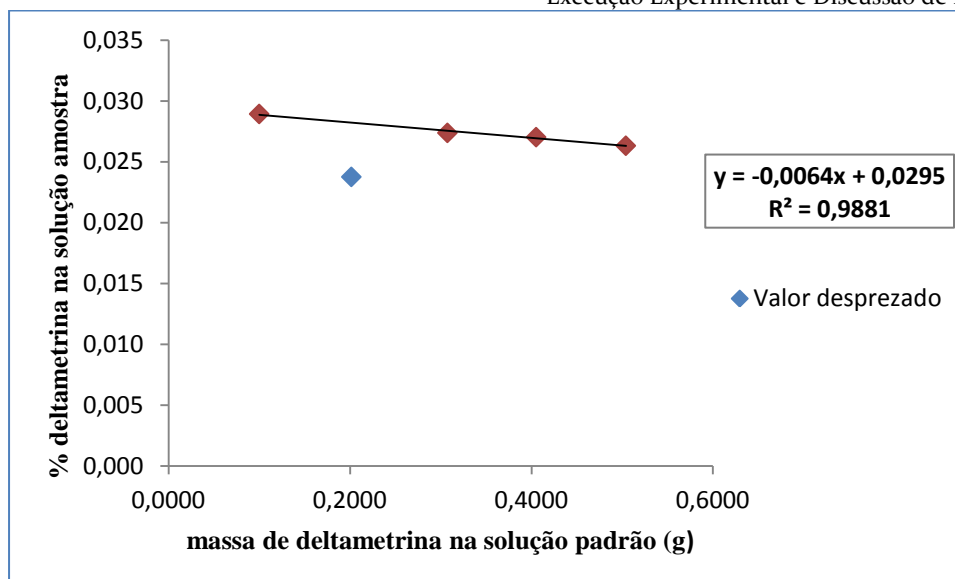


Figura 6.9 - Valores de porcentagem de deltametrina calculadas para uma solução amostra do inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals* usando como referência soluções padrão preparadas com diferentes massas de deltametrina.

Como os valores da porcentagem da deltametrina obtidas para a solução padrão preparada com 0,2016 g de princípio ativo não seguia a tendência observada para os outros casos, tal como se pode ver nas figuras anteriores, este valor foi desprezado, verificando-se, então, uma boa correlação entre a porcentagem de deltametrina calculada e a massa de deltametrina usada na preparação das soluções padrão. Verifica-se que existe uma tendência para o valor da porcentagem de deltametrina calculado para a solução amostra ser menor quando a solução padrão usada como referência é mais concentrada em deltametrina.

#### 6.1.7. Estudo da influência do *split ratio* nos resultados obtidos

Ao longo dos testes realizados foi possível verificar a existência de uma variável que afetava os resultados obtidos, o *split ratio*, e, por isso, foram realizados alguns ensaios com o objetivo de verificar a interferência da sua grandeza nos resultados obtidos.

Para tal foi necessário proceder à preparação de algumas soluções que se passam a descrever:

##### ✓ Solução Padrão Interno

Num gobelé de 100 mL pesar 1,000 g de di-n-hexil ftalato na balança analítica e também 99,0000 g de acetona. Agitar a solução.

##### ✓ Solução Padrão

Pesar 0,1000 g de deltametrina na balança analítica para um balão volumétrico de 50 mL e pipetar 5 mL da solução padrão interno preparada anteriormente e completar com acetona. Levar a solução à unidade de ultrassons por 5 minutos.

##### ✓ Solução Amostra

Pesar 23,0000 g de inseticida *Sinclair* na balança analítica para um balão de 50 mL, pipetar 5 mL da solução padrão interno preparada anteriormente e completar com acetona. Levar a solução à unidade de ultrassons.

A massa de deltametrina usada na preparação da solução padrão foi de 0,1063 g e a massa de inseticida utilizada na preparação da solução amostra foi de 23,0141 g.

Foram realizados ensaios com diferentes razões de *split* para verificar o seu efeito na percentagem calculada para a deltametrina na solução amostra preparada. Na Tabela 6.23 encontram-se os registos das áreas dos picos da deltametrina e do pico do padrão interno para a solução padrão e solução amostra, assim como a correspondente razão das áreas ( $\frac{A_{ativo}}{A_{ISTD}}$ ) e da percentagem de deltametrina calculada para diferentes razões de *split*.

Tabela 6.23 – Área dos picos da deltametrina e do padrão interno para cada razão de *split* e correspondente razão das áreas e percentagem de deltametrina calculada.

Razão <i>split</i>	Solução Padrão			Solução Amostra			% DEL
	Área DEL	Área ISTD	$\frac{A_{ativo}}{A_{ISTD}}$	Área DEL	Área ISTD	$\frac{A_{ativo}}{A_{ISTD}}$	
0,90	1664,13	5546,12	0,30	1333,09	12684,60	0,11	0,0163
10	580,09	3020,97	0,19	412,65	5841,30	0,070	0,0172
20	418,60	2306,06	0,18	325,80	4089,07	0,080	0,0205
30	386,39	2293,89	0,17	320,43	5564,20	0,060	0,0159
40	355,85	2218,23	0,16	213,05	3428,54	0,060	0,0181
50	333,92	2211,26	0,15	246,28	3660,36	0,070	0,0208
60	350,02	2103,57	0,17	253,39	3670,84	0,070	0,0194

Para evidenciar melhor a evolução do fator de resposta na solução padrão e na solução amostra em função da razão de *split* usada na análise cromatográfica, construiu-se o gráfico que se encontra na Figura 6.10.

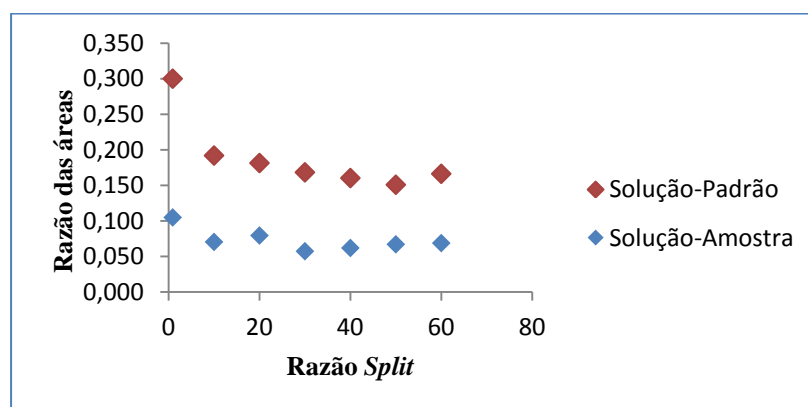


Figura 6.10 – Razão das áreas em função da razão de *split* usada para a solução padrão e para a solução amostra.

Observando a figura anterior, pode-se verificar que para valores da razão de *split* maiores a razão das áreas obtida tanto para a solução padrão como para a solução amostra torna-se praticamente insensível a variações do valor da razão de *split* usada. Em particular, quando a

razão entre o volume de amostra injetado e o volume de amostra que entra na coluna é baixo a razão das áreas apresenta valores mais elevados.

No que diz respeito à percentagem da deltametrina calculada para a solução amostra quando se realizam ensaios com diferentes razões de *split*, esta está apresentada na Figura 6.11, com a indicação da reta que melhor se ajusta aos resultados obtidos.

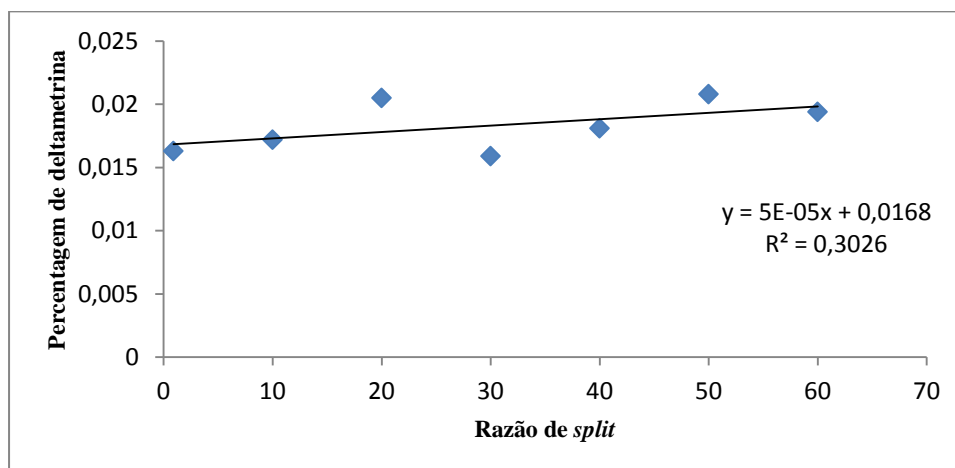


Figura 6.11 – Percentagem de deltametrina a solução amostra em função da razão de *split* para o inseticida do cliente *Sinclair*.

Analisando o gráfico anterior pode-se verificar que os valores estão um pouco dispersos, obtendo-se portanto um valor de correlação baixo, o que significa que a razão de *split* não tem influência na percentagem do princípio ativo no inseticida o que seria de esperar.

## 6.2. Desenvolvimento e Validação dos Inseticidas dos clientes *Aragon* e *Rentokil*

Como já foi referido anteriormente, durante o estágio chegaram à COLEP novos inseticidas em que era necessário proceder-se ao desenvolvimento de análise dos princípios ativos. E entre os inseticidas desenvolvidos estão dois inseticidas do cliente *Aragon* (*Aragon I* e *Aragon II*) e dois inseticidas do cliente *Rentokil* (*Rentokil I* e *Rentokil II*).

Como foi necessário proceder-se ao rápido desenvolvimento destes métodos o estudo individual dos picos de cada princípio ativo nem sempre é possível. Sendo assim verifica-se se já existe algum método desenvolvido que contenha alguns dos princípios ativos que estão presentes no inseticida a analisar. Caso exista, usa-se a mesma massa de cada princípio ativo em comum do método já desenvolvido, e para os outros princípios ativos utiliza-se uma massa próxima dos restantes princípios ativos. Desta forma procede-se à análise da solução padrão e de seguida à análise da solução amostra, e verifica-se através dos resultados se há necessidade de aumentar ou diminuir a concentração de cada princípio ativo na solução padrão.



### 6.2.1. Inseticida *Aragon I*

O inseticida *Aragon I* contém na sua formulação quatro princípios ativos, o butóxido de piperonilo, a permetrina, a neopinamina e a cipermetrina. Para este inseticida já existia na COLEP um método desenvolvido que determinava os picos da permetrina, neopinamina e butóxido de piperonilo. Sendo assim, já se tinha o conhecimento das condições de operação a utilizar e consequentemente os tempos de retenção a que correspondia cada um destes princípios ativos, pelo que apenas os picos da cipermetrina iriam aparecer de novo no cromatograma.

Os reagentes, material e equipamento utilizados no desenvolvimento do método de análise dos princípios ativos presentes no inseticida *Aragon I* apresentam-se de seguida.

#### 6.2.1.1. Reagentes, Material e Equipamento

Para se proceder ao desenvolvimento deste método foram necessários vários reagentes, os princípios ativos, o padrão interno e o solvente.

Na Tabela 6.24 estão listados os reagentes utilizados, bem como o seu grau de pureza, riscos que lhes estão associados e as respetivas medidas de controlo.

**Tabela 6.24 - Lista de reagentes utilizados no desenvolvimento do método *Aragon I*, percentagem de pureza, risco e medidas de controlo associados.**

Reagentes	% Pureza	Risco Significativo	Medida de Controlo
di-butil ftalato (padrão interno)	99,90	Pode causar danos a recém nascidos, possível risco de comprometer a fertilidade.	Usar luvas de nitrilo. Não realizar este teste se estiver grávida.
butóxido de piperonilo (princípio ativo)	95,05	Nenhum	Usar luvas de nitrilo, Óculos
permetrina (princípio ativo)	95,20	Irritante	Usar luvas de nitrilo, Óculos
cipermetrina (princípio ativo)	97,20	Irritante	Usar luvas de nitrilo, Óculos
neopinamina (princípio ativo)	96,33	Irritante	Usar luvas de nitrilo, Óculos
acetona (solvente)	98,00	Inflamável, Irritante	Usar óculos e luvas. Manter afastado de fontes de calor.

O material de laboratório utilizado para a implementação do método e os seus respetivos erros associados, são indicados de seguida:



- ✓ gobelés - 250 mL
- ✓ balão volumétrico -  $100 \pm 0,10$  mL
- ✓ pipeta volumétrica -  $10 \pm 0,04$  mL
- ✓ pipeta de Pasteur

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste método foram os mesmos que no método de *Sinclair e Gerhardt Pharmaceuticals*, excepto o GC-FID utilizado, que neste caso foi um cromatógrafo da marca Agilent e da série 6890, equipado com um detetor de ionização de chama, um injetor com divisor de amostra do tipo *split/splitless* e integração digital assegurada pelo software *ChemStation*. A coluna utilizada era do tipo capilar com as dimensões de  $30\text{m} \times 320\mu\text{m} \times 0,25\mu\text{m}$ . A fase estacionária era do tipo HP-1, ou seja, 100% dimetipolisiloxano, que é uma fase estacionária apolar, com uma boa performance para moléculas com baixo peso molecular e os seus limites de temperaturas são de -60 a 325/350 °C.

Após algumas análises teste, para verificar as massas de cada princípio ativo a utilizar na solução padrão, chegou-se às seguintes soluções finais:

✓ **Solução Padrão Interno**

Num balão volumétrico de 100 mL pesar 1,0000g de di-butil ftalato na balança analítica e 99,0000 g de acetona. Agitar a solução.

✓ **Solução Padrão**

Pesar 0,2000 g de butóxido de piperonilo, 0,1700 g de permetrina, e 0,1700 g de cipermetrina e 0,1500 g de neopinamina na balança analítica para um balão volumétrico de 100 mL. Pipetar 10 mL da solução de padrão interno preparada anteriormente e completar com acetona. Levar a solução ao equipamento de ultrassons por 5 minutos.

✓ **Solução Amostra**

Pesar aproximadamente 10,0000 g de inseticida na balança analítica para um balão volumétrico de 100 mL, adiciona 10 mL da solução de padrão interno e completar com acetona. Levar a solução ao equipamento de ultrassons por 5 minutos.

Na Tabela 6.25 constam os caudais de hidrogénio, hélio e ar reconstituído utilizados e, na Tabela 6.26 estão indicados os programas de temperatura usados nos diferentes componentes do cromatógrafo. O tempo de análise para cada solução é de 1 hora.

Tabela 6.25 – Caudais de hélio, hidrogénio e ar reconstituído utilizados no GC-FID durante a análise das soluções.

Gás	Caudal (mL/min)	Local do GC
Hélio	68,10	Injetor
Hidrogénio	40,00	Detetor
Ar reconstituído	450,0	Detetor

**Tabela 6.26 - Condições de temperatura dos componentes do GC-FID.**

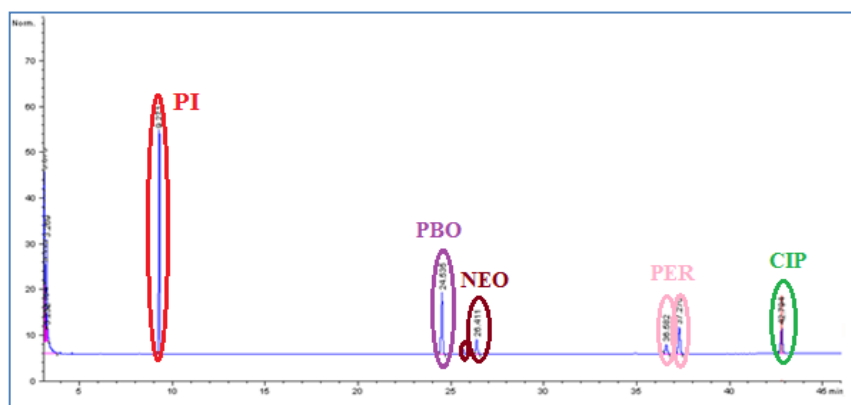
<b>Injetor</b>	250 °C
<b>Forno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inicial: 165 °C</li> <li>• Final: 255 °C (manter por 60 minutos)</li> <li>• Variação: 1,50 °C/min</li> </ul>
<b>Detetor</b>	300 °C

Depois de se preparar as soluções anteriores procedeu-se à injeção de 1,5 µL, realizando-se 7 ensaios com réplicas da solução padrão e da solução amostra. Na Tabela 6.27 apresentam-se os valores das massas de cada princípio ativo e inseticida utilizados na formulação das soluções padrão.

**Tabela 6.27 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra nos 7 ensaios efetuados.**

Ensaio	m (PBO) (g)	m (PER) (g)	m (CIP) (g)	m (NEO)(g)	m (inseticida) (g)
1	0,2015	0,1714	0,1715	0,1516	10,0034
2	0,2084	0,1984	0,1739	0,1750	10,0161
3	0,2084	0,1984	0,1739	0,1750	10,0210
4	0,2003	0,1737	0,1700	0,1519	10,0042
5	0,2015	0,1714	0,1715	0,1516	10,0161
6	0,2015	0,1714	0,1715	0,1516	10,0210
7	0,2084	0,1984	0,1739	0,1750	10,0034

Com as condições de operação indicadas na Tabela 6.25 e na Tabela 6.26 procedeu-se à injeção da solução padrão, e de seguida da solução amostra, encontrando-se na Figura 6.12 um exemplo dos cromatogramas registados durante a análise.



**Figura 6.12 – Cromatograma obtido na análise da solução padrão do inseticida Aragon I.**

Os tempos de retenção obtidos foram de 9,2 minutos para o padrão interno, de 24,5 minutos para o butóxido de piperonilo, 25,6 e 26,4 minutos para os dois picos da

neopinamina, 36,5 e 37,3 minutos para os dois picos de permetrina e finalmente 42,8 minutos para a cipermetrina.

Sendo a fase estacionária apolar, os compostos polares deverão ser os primeiros a eluir. Como os princípios ativos são todos apolares, ou muito pouco polares, com exceção da neopinamina (que, segundo a literatura, é solúvel em água, logo é polar), este princípio ativo deveria ser o primeiro a eluir, o que não acontece, devido a uma outra propriedade importante na eluição de compostos em cromatografia, o ponto de ebulição. O primeiro princípio ativo a eluir, por ordem crescente de ponto de ebulição, deveria ser o butóxido de piperonilo, de seguida a neopinamina, a permetrina e a cipermetrina (ver pontos de ebulição na Tabela 3.5), no entanto, a permetrina elui primeiro que a cipermetrina, que se pode concluir que a cipermetrina é mais apolar em relação à permetrina permanecendo, por isso, mais tempo na coluna.

De seguida apresentam-se na Tabela 6.28 as áreas obtidas dos picos dos princípios ativos da solução padrão e da solução amostra, tendo em conta que a área de cada princípio ativo é a soma de todos os picos obtidos para esse princípio ativo, e a área obtida do pico do padrão interno da solução padrão e da solução amostra.

**Tabela 6.28 – Áreas obtidas para os princípios ativos e padrão interno na solução padrão e solução amostra para o inseticida *Aragon I* nas 7 soluções padrão e amostra analisadas.**

Ensaio	Solução-Padrão					Solução - Amostra				
	A (PBO)	A (PER)	A (CIP)	A (NEO)	A (ISTD)	A (PBO)	A (PER)	A (CIP)	A (NEO)	A (ISTD)
1	237,40	206,50	206,30	181,90	158,00	82,39	63,84	55,35	28,66	178,12
2	188,80	202,73	168,28	168,99	129,28	80,60	54,51	42,62	20,50	173,84
3	188,80	202,73	168,28	168,99	129,28	90,87	71,11	63,21	31,65	191,99
4	235,50	230,29	217,73	182,88	154,23	102,77	75,36	75,37	31,70	209,82
5	237,40	206,50	206,30	181,90	158,00	80,60	54,51	42,62	20,50	173,84
6	237,40	206,50	206,30	181,90	158,00	90,87	71,11	63,21	31,65	191,99
7	188,80	202,73	168,28	168,99	129,28	82,39	63,84	55,35	28,66	178,12

A partir dos resultados das análises efetuadas, calculou-se os valores da percentagem de cada princípio ativo utilizando a Equação 5.9 e verificou-se que se encontravam dentro das especificações requeridas pelo cliente, considerou-se, então, que o método estava desenvolvido. A percentagem de cada princípio ativo no inseticida *Aragon I* obtida nos 7 ensaios realizados, média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) e especificações do cliente encontram-se apresentados na Tabela 6.29.

**Tabela 6.29 – Percentagem de cada princípio ativo no inseticida *Aragon I* nos 7 ensaios efetuados e respetiva média, desvio padrão e especificação do cliente.**

Ensaio	% PBO	% NEO	% PER	% CIP
1	0,589	0,204	0,447	0,397
2	0,628	0,152	0,377	0,318
3	0,641	0,212	0,445	0,427
4	0,611	0,184	0,398	0,420
5	0,590	0,149	0,391	0,313
6	0,602	0,209	0,461	0,419
7	0,627	0,207	0,432	0,403
$\bar{x}$	0,613	0,188	0,422	0,385
$\sigma$	0,0200	0,0273	0,0326	0,0490
<b>Especificações</b>	0,540-0,660	0,180-0,220	0,360-0,400	0,360-0,440

Analisando a tabela anterior verifica-se que para o princípio ativo permetrina a média da percentagem na solução amostra obtida experimentalmente encontra-se acima da especificação requerida pelo cliente. Verifica-se também que o desvio padrão é maior para a cipermetrina, ou seja os valores obtidos encontram-se mais dispersos em torno da média que nos restantes princípios ativos.

#### 6.2.1.2. Validação do Método *Aragon I*

A validação de métodos analíticos compreende a determinação de certos parâmetros estatísticos, conforme foi descrito no Capítulo 5. Para o método usado na determinação dos princípios ativos presentes no inseticida *Aragon I* apenas se vai apresentar o estudo da precisão e exatidão do método desenvolvido, já que não foram realizados os ensaios necessários para a determinação dos restantes parâmetros, uma vez que a validação deste método não constituía objetivo do estágio.

Os erros aleatórios ocorridos ao longo do desenvolvimento dos métodos deverão seguir uma distribuição normal ou de Gauss. Para verificar se os resultados obtidos experimentalmente apresentam esta característica foi realizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*, conforme descrito anteriormente. Na Tabela 6.30 encontram-se os valores de *D* obtido experimentalmente, de acordo com a equação 5.23 e o valor de *D* obtido através das tabelas de *Kolmogorov-Smirnov* para um nível de significância de 5 % (ver Anexo V) (Câmara e Silva, 2001), para cada princípio ativo do método desenvolvido para o inseticida *Aragon I*.

**Tabela 6.30 - Valores de  $D_{exp}$  e de  $D_{tab}$  para cada princípio ativo do método do inseticida Aragon I.**

Princípio ativo	$D_{exp}$	$D_{tab}$
PBO	0,1961	0,4860
NEO	0,2898	
PER	0,1939	
CIP	0,3057	

Analisando a tabela anterior verifica-se que para todos os princípios ativos o valor de  $D$  obtido experimentalmente é menor que o valor de  $D$  obtido das tabelas do teste de *Kolmogorov-Smirnov*, o que significa que os erros obtidos seguem uma distribuição normal, verifica-se também que o princípio ativo que menos se aproxima de uma distribuição normal é a cipermetrina e o que mais se assemelha a uma distribuição normal é o butóxido de piperonilo.

Na Tabela 6.31 encontram-se indicados os valores de mais três parâmetros que traduzem a precisão dos resultados obtidos nos ensaios realizados para cada princípio ativo durante o desenvolvimento do método de análise do inseticida *Aragon I*: a variância ( $S^2$ ), o desvio padrão médio ( $\sigma_m$ ) e a constante de variância ( $CV$ ).

**Tabela 6.31 – Variância, desvio padrão médio e coeficiente de variância calculados para os ensaios realizados cada princípio ativo durante o desenvolvimento do método do inseticida Aragon I.**

Princípio ativo	$S^2$	$\sigma_m$	$CV$
PBO	3,99E-08	0,0076 %	3,26 %
NEO	7,44E-08	0,0103 %	14,49 %
PER	1,06E-07	0,0124 %	7,74 %
CIP	2,40E-08	0,0185 %	12,72 %

Verifica-se que o desvio padrão médio é maior para a cipermetrina mostrando deste modo que a média dos seus valores afetada pelos erros aleatórios será  $(0,3850 \pm 0,0185)$  %, encontrando-se, portanto, dentro do valor especificado pelo cliente. O princípio ativo que apresenta menor variância é o butóxido de piperonilo. Quanto ao coeficiente de variância é maior para a percentagem de neopinamina mostrando assim que, a dispersão em torno da média é de 14,49 %, enquanto que para o princípio ativo butóxido de piperonilo é de apenas 3,26%.

Para a análise da exatidão recorreu-se ao método dos MRC (materiais de referência certificados), usando-se como aproximação, como já foi referido anteriormente, o valor intermédio do intervalo de valores fornecido pelo cliente, que se assume ser o valor considerado como verdadeiro. Na Tabela 6.32 encontram-se a gama de valores fornecida pelo cliente para cada um dos princípios ativos, o valor considerado verdadeiro, a média dos valores da percentagem obtidos experimentalmente para cada princípio ativo e o erro relativo ( $Er$ ).

**Tabela 6.32 - Gama de valores para a percentagem de cada princípio ativo fornecida pelo cliente, valor considerado verdadeiro, média obtida dos valores experimentais ( $\bar{x}$ ) e erro relativo ( $Er$ ) para cada princípio ativo do inseticida *Aragon I*.**

Princípio ativo	Gama fração de princípio ativo (%)	Valor assumido como verdadeiro (%)	$\bar{x}$ (%)	$Er$ (%)
PBO	0,540-0,660	0,600	0,613	2,09
NEO	0,180-0,220	0,200	0,188	5,88
PER	0,360-0,400	0,380	0,422	10,96
CIP	0,360-0,440	0,400	0,385	3,68

Pode-se verificar analisando a Tabela 6.32 que para o butóxido de piperonilo, neopinamina e cipermetrina o valor da percentagem de ativo verdadeiro encontra-se bastante próximo da média dos valores obtidos experimentalmente, no entanto o mesmo não se verifica para a permetrina, o que vem de encontro aos resultados anteriores. Considera-se como um ensaio satisfatório aquele cujo erro relativo é igual ou inferior a 5 %, pelo que a análise da permetrina será a menos exata e a do butóxido de piperonilo a mais satisfatória, com um erro relativo de 2,09 %.

A averiguação da existência de erros sistemáticos pode ser efetuada usando o teste  $t$  da distribuição de *Student*, sendo o valor de  $t$  calculado recorrendo à equação 5.27. Este valor deverá ser comparado com o valor de  $t$  obtido das tabelas de distribuição de *Student* (ver Anexo VI). Na Tabela 6.33 encontram-se os valores de  $t$  calculado ( $t_{cal}$ ) e o valor de  $t$  retirado das tabelas de distribuição de *Student* para 0,5 % de significância (Fernandes, 1999) e para um número de ensaios de 7, para todos os princípios ativos do inseticida *Aragon I*.

**Tabela 6.33 - Valores obtidos para o  $t_{cal}$  e  $t$  das tabelas de distribuição de *Student* para 0,5 % de significância para os resultados obtidos no desenvolvimento do método do inseticida *Aragon I* para cada um dos seus princípios ativos.**

Princípio ativo	$ t_{cal} $	$t$
PBO	1,662	2,447
NEO	1,141	
PER	3,378	
CIP	0,7960	

Tal como seria de esperar a permetrina é o princípio ativo para o qual o método desenvolvido não é satisfatório pois ficou evidenciado estatisticamente a existência de erros sistemáticos, comprovando assim que o maior problema do método desenvolvido reside na determinação da permetrina, uma vez que o valor de  $|t_{cal}|$  é maior que o valor de  $t$  retirado das tabelas de distribuição de *Student*.

Para se concluir quanto ao desempenho de um método desenvolvido é necessário conhecer o valor de  $Z$ , tal como foi discutido no Capítulo 5 e cujo valor é calculado usando a Equação 5.28. Na Tabela 6.34 encontram-se os valores da incerteza associado ao valor assumido como verdadeiro ( $I$ ), valores de desempenho ( $Z$ ) e da percentagem de exatidão calculados a partir dos resultados obtidos nos ensaios realizados para cada um dos princípios ativos no desenvolvimento do método do inseticida *Aragon I*.

**Tabela 6.34 - Valores obtidos para a incerteza do valor verdadeiro ( $I$ ), desempenho ( $Z$ ) e exatidão dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do método do inseticida *Aragon I* para cada um dos princípios ativos.**

Princípio ativo	$I$	$Z$	Exatidão (%)
PBO	0,060	0,210	102,09
NEO	0,020	0,590	94,120
PER	0,020	2,08	110,96
CIP	0,040	0,370	96,320

Verifica-se através da análise da tabela anterior que o desempenho do método para o princípio ativo permetrina é questionável, uma vez que é superior a 2, ainda que inferior a 3. O princípio ativo mais exato é o butóxido de piperonilo com 102, 09 %, enquanto que o menos exato é a permetrina com 110,96 % de exatidão, uma vez que, como já foi referido anteriormente, o valor considerado verdadeiro para a percentagem de permetrina é mais baixo que a média dos valores obtida experimentalmente.

### 6.2.2. Desenvolvimento do Método *Aragon II*

O inseticida *Aragon II* além do butóxido de piperonilo, da permetrina, da neopinamina e da cipermetrina, contém também o bendiocarbe. No que diz respeito ao equipamento utilizado neste método foi o mesmo GC-FID utilizado para desenvolver o método dos inseticidas *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*.

Na Tabela 6.35 encontram-se a percentagem de pureza, os cuidados e os riscos a ter com o princípio ativo bendiocarbe. Os restantes reagentes são os mesmos que foram utilizados no método anterior, cuja caracterização foi apresentada na Tabela 6.24.

**Tabela 6.35 - Percentagem de pureza, risco e medida de controlo para o princípio ativo bendiocarbe.**

Reagentes	% Pureza	Risco Significativo	Medida de Controlo
bendiocarbe (princípio ativo)	96,6	Irritante	Usar luvas de nitrilo. Óculos

Após algumas análises teste, para otimizar as massas de cada princípio ativo a utilizar na solução padrão, adotou-se as seguintes soluções finais:

#### ✓ Solução Padrão Interno

Num balão volumétrico de 100 mL pesar 1,0000g de di-butil ftalato na balança analítica e 99,0000 g de acetona. Agitar a solução

### ✓ Solução Padrão

Pesar 0,2000 g de butóxido de piperonilo, 0,1700 g de permetrina, 0,1700 g de cipermetrina, 0,1500 g de neopinamina e 0,1700 g de bendiocarbe na balança analítica e colocar num balão volumétrico de 100 mL. Pipetar 10 mL da solução de padrão interno preparada anteriormente e completar com acetona. Levar a solução ao equipamento de ultrassons por 5 minutos.

### ✓ Solução Amostra

Pesar aproximadamente 10,0000 g de inseticida na balança analítica para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 10 mL da solução de padrão interno e completar com acetona. Levar a solução ao equipamento de ultrassons por 5 minutos.

Na Tabela 6.36 constam os caudais de hidrogénio, hélio e ar reconstituído utilizados nos diferentes componentes do cromatógrafo, e, na Tabela 6.37, estão indicados os programas de temperatura usados nos diferentes componentes do cromatógrafo. O tempo de análise para cada solução é de 1 hora.

Tabela 6.36 – Caudais de hélio, hidrogénio e ar reconstituído no GC-FID durante a análise das soluções.

Gás	Caudal (mL/min)	Local do GC
Hélio	482,0	Injetor
Hidrogénio	40,00	Detetor
Ar reconstituído	450,0	Detetor

Tabela 6.37 – Condições de temperatura dos componentes do GC-FID.

<b>Injetor</b>	250 °C
<b>Forno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inicial: 165 °C</li> <li>• Final: 255 °C (manter por 30 minutos)</li> <li>• Variação: 3 °C/min</li> </ul>
<b>Detetor</b>	300 °C

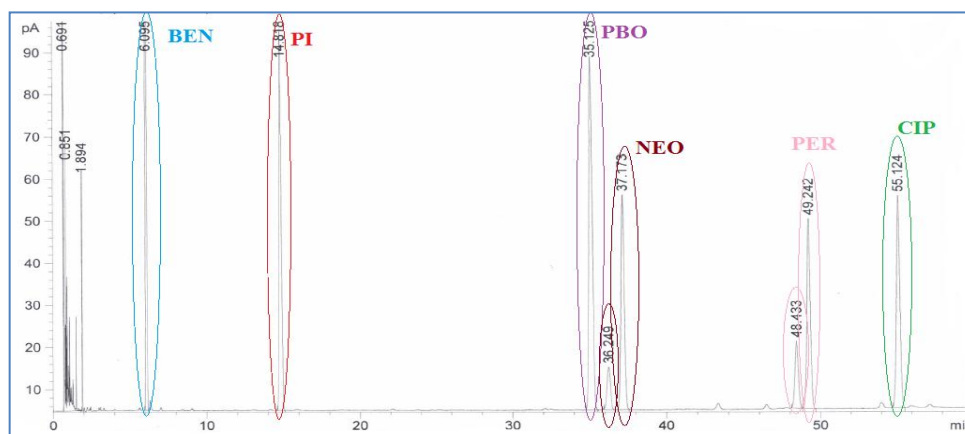
Depois de se preparar as soluções anteriores procedeu-se à injeção de 1,5 µL, realizando-se 10 ensaios com réplicas da solução padrão e solução amostra. As massas de cada princípio ativo e inseticida utilizadas na formulação das respetivas soluções encontram-se na Tabela 6.38.



**Tabela 6.38 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra nos 10 ensaios efetuados para o inseticida *Aragon II*.**

Ensaio	m (PBO) (g)	m (PER) (g)	m (CIP) (g)	m (NEO)(g)	m (BEN) (g)	m (inseticida) (g)
1	0,2190	0,1734	0,191	0,1512	0,1714	10,0120
2	0,2000	0,1701	0,1725	0,1505	0,1730	10,0015
3	0,2080	0,1761	0,1840	0,1501	0,1787	10,0210
4	0,2051	0,1700	0,1718	0,1508	0,1700	10,0011
5	0,2051	0,1700	0,1718	0,1508	0,1700	10,0011
6	0,2051	0,1700	0,1718	0,1508	0,1700	10,0046
7	0,2051	0,1700	0,1718	0,1508	0,1700	10,0072
8	0,2051	0,1700	0,171	0,1508	0,1700	10,0011
9	0,2051	0,1700	0,1718	0,1508	0,1700	10,0011
10	0,2125	0,1758	0,1781	0,1503	0,1713	10,0072

Com as condições de operação indicadas na Tabela 6.36 e na Tabela 6.37 procedeu-se à injeção da solução padrão, e de seguida da solução amostra, estando na Figura 6.13 um exemplo dos cromatogramas registados durante a análise.



**Figura 6.13 – Cromatograma obtido na análise da solução padrão do inseticida *Aragon II*.**

O tempo de retenção obtido para o padrão interno foi de 14,8 minutos, do bendiocarbe foi de 6,0 minutos, do butóxido de piperonilo foi de 35,0 minutos, para os dois picos da neopinamina foi de 36,2 minutos e de 47,1 minutos, para os dois picos de permetrina foi de 48,3 minutos e 49,2 minutos e a cipermetrina tem o tempo de retenção de 55,1 minutos.

A ordem de eluição da coluna é a mesma que no método *Aragon I*, mas como estas soluções apresentam mais um princípio ativo, o bendiocarbe. Apesar deste possuir um ponto de ebulição superior a todos os outros princípios ativos, é o primeiro princípio ativo a eluir da

coluna, o que se deverá ao fato de o bendiocarbe ser o princípio ativo mais polar, tendo, assim, menos afinidade com a fase estacionária e eluindo mais rapidamente.

Na Tabela 6.39 e na Tabela 6.40 apresentam-se as áreas obtidas dos picos dos princípios ativos da solução padrão e solução amostra, respectivamente. De referir que, a área de cada princípio ativo resulta da soma das áreas de todos os picos obtidos para os diferentes isômeros desse princípio ativo.

**Tabela 6.39 - Áreas obtidas para os princípios ativos e padrão interno na solução padrão para o inseticida *Aragon II* nas 10 soluções padrão analisadas.**

Ensaio	Solução-Padrão					
	A (PBO)	A (PER)	A (CIP)	A (NEO)	A (BEN)	A (ISTD)
1	1217,06	966,15	952,31	842,11	996,11	867,61
2	944,96	799,36	728,09	721,47	672,23	677,36
3	1011,49	897,80	912,33	787,47	1541,63	774,91
4	1192,36	900,18	746,47	878,88	1098,05	929,44
5	1192,36	900,18	746,47	878,88	1098,05	929,44
6	1192,36	900,18	746,47	878,88	1098,05	929,44
7	1192,36	900,18	746,47	878,88	1098,05	929,44
8	1249,88	978,02	812,36	916,10	1022,74	908,61
9	910,41	704,38	600,54	660,60	793,93	707,70
10	975,21	785,47	654,75	710,89	783,35	700,36

**Tabela 6.40 - Áreas obtidas para os princípios ativos e padrão interno na solução amostra para o inseticida *Aragon II* nas 10 soluções amostra analisadas.**

Ensaio	Solução-Amostra					
	A (PBO)	A (PER)	A (CIP)	A (NEO)	A (BEN)	A (ISTD)
1	603,15	253,01	286,91	186,94	530,67	910,89
2	910,15	384,28	386,72	277,42	694,42	1300,02
3	603,15	253,01	286,91	186,94	530,67	910,89
4	543,94	230,90	128,64	183,87	461,36	933,16
5	499,19	209,73	113,91	164,45	398,65	878,72
6	607,62	219,24	228,33	178,71	482,35	926,40
7	469,65	175,41	180,69	139,70	386,63	731,88
8	431,50	185,77	156,74	142,38	458,21	835,88

Ensaio	Solução-Amostra					
	A (PBO)	A (PER)	A (CIP)	A (NEO)	A (BEN)	A (ISTD)
9	431,50	185,77	156,74	142,38	458,21	835,88
10	469,65	175,41	180,69	139,70	386,63	731,88

A partir dos resultados das análises efetuadas, foram calculados os valores da percentagem de cada princípio ativo, de acordo com a Equação 5.9 que se apresenta na Tabela 6.41, na qual podem ainda ser observadas a média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) dos resultados obtidos, bem como as especificações do cliente.

Tabela 6.41 - Percentagem de cada ativo no inseticida *Aragon II* nos 10 ensaios efetuados e respetiva média, desvio padrão e especificação do cliente.

Ensaio	% PBO	% NEO	% PER	% CIP	% BEN
1	0,981	0,308	0,411	0,532	0,839
2	0,954	0,290	0,406	0,464	0,899
3	1,001	0,291	0,401	0,477	0,504
4	0,886	0,299	0,414	0,287	0,687
5	0,864	0,284	0,399	0,269	0,631
6	0,997	0,293	0,396	0,512	0,723
7	0,975	0,290	0,401	0,513	0,734
8	0,732	0,243	0,334	0,350	0,800
9	0,783	0,262	0,362	0,369	0,802
10	0,931	0,269	0,358	0,457	0,781
$\bar{x}$	0,910	0,283	0,388	0,423	0,740
$\sigma$	0,0932	0,0195	0,0269	0,0967	0,1130
Especificações	0,900-1,10	0,270-0,330	0,360-0,400	0,450-0,550	0,720-0,880

Apesar de se ter verificado que algumas amostras não se encontravam dentro das especificações requeridas pelo cliente (assinaladas a vermelho na tabela anterior), de acordo com a prática da COLEP, o método foi considerado desenvolvido.

O princípio ativo cipermetrina é o único em que a média dos resultados obtidos não se encontra dentro das especificações do cliente, no entanto é no bendiocarbe que os valores estão mais dispersos em relação à média.

#### 6.2.2.1. Validação do Método *Aragon II*

Como já foi referido anteriormente o estudo da validação de métodos compreende a realização de determinações específicas que não foram realizadas no desenvolvimento destes

métodos. Assim, para o método do inseticida *Aragon II*, e com base nos ensaios realizados, apenas vai ser possível efetuar-se o estudo da precisão e exatidão do método desenvolvido.

Para verificar se os erros ocorridos ao longo do desenvolvimento do método podem ser considerados aleatórios, seguindo, por isso, uma distribuição normal ou de Gauss, foi aplicado aos resultados obtidos e apresentados na Tabela 6.41 o teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

Na Tabela 6.42 encontram-se os valores de  $D$  obtido experimentalmente através da equação 5.23 e o valor de  $D$  obtido através das tabelas de *Kolmogorov-Smirnov* para um nível de significância de 5 % (ver Anexo V) (Câmara e Silva, 2001), para cada princípio ativo do método desenvolvido para o inseticida *Aragon II*.

**Tabela 6.42 - Valores de  $D_{exp}$  e de  $D_{tab}$  para cada princípio ativo do método do inseticida *Aragon II*.**

Princípio ativo	$D_{exp}$	$D_{tab}$
PBO	0,1866	0,4100
NEO	0,2358	
PER	0,3109	
CIP	0,2365	
BEN	0,1413	

Analisando a tabela anterior, verifica-se que para todos os princípios ativos os resultados experimentais obtidos na determinação da percentagem de princípio ativo no inseticida apresentam um valor de  $D_{exp}$  inferior ao de  $D_{tab}$  pelo que se pode concluir que os erros observados seguem uma distribuição normal.

Na Tabela 6.43 encontram-se indicados os valores de mais três parâmetros que traduzem a precisão dos resultados obtidos nos ensaios realizados para cada princípio ativo durante o desenvolvimento do método do inseticida *Aragon II*: a variância ( $S^2$ ), o desvio padrão médio ( $\sigma_m$ ) e a constante de variância (CV).

**Tabela 6.43 - Variância, desvio padrão médio e coeficiente de variância calculados para os ensaios realizados cada princípio ativo durante o desenvolvimento do método do inseticida *Aragon II*.**

Princípio ativo	$S^2$	$\sigma_m$	CV
PBO	8,678E-07	0,0295 %	10,23 %
NEO	3,792E-06	0,0062 %	6,88 %
PER	7,226E-06	0,0085 %	6,93 %
CIP	9,349E-05	0,0306 %	22,85 %
BEN	1,277E-04	0,0357 %	15,27 %

Verifica-se que o desvio padrão médio é maior para o bendiocarbe. O valor da percentagem de bendiocarbe no inseticida *Aragon II* obtido nos ensaios efetuados é de (0,740±0,0357) %, pelo que o valor mínimo da gama, de 0,7043 % se encontra fora das

especificações requeridas pelo cliente. Quanto ao coeficiente de variância este parâmetro é maior para a cipermetrina mostrando que em média os desvios relativamente à média atingem os 22,85 % do valor desta.

Para determinar a exatidão do método tomou-se, tal como referido anteriormente, como valor de referência o valor intermédio da gama de especificação fornecida pelo cliente, na qual se considera encontrar o valor verdadeiro. Na Tabela 6.44 encontram-se indicados a gama de fração de princípio ativo presente no inseticida fornecida pelo cliente para cada um dos princípios ativos, o valor que se assume como verdadeiro, a média dos valores obtidos experimentalmente para cada princípio ativo e o respetivo erro relativo ( $Er$ ).

**Tabela 6.44 - Gama de valores para a percentagem de cada princípio ativo fornecida pelo cliente, valor considerado verdadeiro, média obtida dos valores experimentais ( $\bar{x}$ ) e erro relativo ( $Er$ ) para cada princípio ativo do inseticida *Aragon II*.**

Princípio ativo	Gama de fração de princípio ativo (%)	Valor assumido como verdadeiro (%)	$\bar{x}$ (%)	$Er$ (%)
PBO	0,900-1,10	1,00	0,910	8,97
NEO	0,270-0,330	0,300	0,283	5,72
PER	0,360-0,400	0,380	0,388	2,14
CIP	0,450-0,550	0,500	0,423	15,38
BEN	0,720-0,880	0,800	0,740	7,49

Pode-se verificar que para a neopinamina e para permetrina o valor da percentagem de ativo assumido como verdadeiro encontra-se bastante próximo do valor obtido experimentalmente. Considera-se como um ensaio satisfatório quando o erro relativo é inferior ou igual a 5 %, o que apenas se observa para a permetrina. O princípio ativo que se afasta mais do valor assumido como verdadeiro é a cipermetrina com um erro relativo de 15,38%, o que era expectável, uma vez que é o único princípio ativo que nas determinações experimentais registou um valor médio que se encontra fora das especificações requeridas pelo cliente.

Para despistar a existência de erros sistemáticos na quantificação destes cinco princípios ativos presentes no inseticida em estudo, recorreu-se ao teste  $t$  da distribuição de *Student*, cuja determinação é efetuada com recurso à equação 5.27. Este valor deverá ser comparado com o valor de  $t$  obtido das tabelas de distribuição de *Student*. Na Tabela 6.45 encontra-se os valores de  $t$  calculado ( $t_{cal}$ ) e o valor de  $t$  retirado das tabelas de distribuição de *Student* para 0,5 % de significância ( ver Anexo VI) (Fernandes, 1999) e para um número de ensaios de 10, para todos os princípios ativos do inseticida *Aragon II*.

**Tabela 6.45 - Valores obtidos para o  $t_{cal}$  e  $t$  das tabelas de distribuição de *Student* para 0,5 % de significância para os resultados obtidos no desenvolvimento do método do inseticida *Aragon II* para cada um dos seus princípios ativos.**

Princípio ativo	$ t_{cal} $	$t$
PBO	3,046	2,262
NEO	2,788	
PER	0,956	
CIP	2,516	
BEN	1,677	

Tal como seria de esperar a permetrina é o princípio ativo em que o ensaio é mais satisfatório pois ficou estatisticamente evidenciado a não existência de erros sistemáticos idêntica conclusão é também aplicável ao bendiocarbe. Por outro lado, para o butóxido de piperonilo, a neopinamina e a cipermetrina ficou estatisticamente comprovado a existência de erros sistemáticos, uma vez que o valor de  $t_{cal}$  é maior que o valor de  $t$  retirado das tabelas de distribuição de *Student*.

Na avaliação do desempenho do método com base no valor do parâmetro  $Z$ , tal como foi discutido no Capítulo 5 recorreu-se à Equação 5.28. Na Tabela 6.46 encontram-se o valor de incerteza associado ao valor considerado verdadeiro ( $I$ ) desempenho ( $Z$ ) e da percentagem de exatidão calculados a partir dos resultados obtidos nos ensaios realizados para cada um dos princípios ativos no desenvolvimento do método aplicável ao inseticida *Aragon II*.

**Tabela 6.46 - Valores obtidos para o desempenho ( $Z$ ) e exatidão dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do método do inseticida *Aragon II* para cada um dos princípios ativos.**

Princípio ativo	$I$	$Z$	Exatidão (%)
PBO	0,1	0,900	91,03
NEO	0,03	0,570	94,28
PER	0,02	0,410	102,14
CIP	0,05	1,54	84,62
BEN	0,08	0,750	92,51

Verifica-se através da análise da tabela anterior que o desempenho não é questionável para nenhum dos princípios ativos, uma vez que todos eles apresentam um valor do parâmetro  $Z$  superior a 2, embora no caso da cipermetrina aquele parâmetro apresente um valor muito próximo desse limite. O princípio ativo mais exato é a permetrina com 102,62%, já o menos exato é a cipermetrina com 84,62% de exatidão.

### 6.2.3. Desenvolvimento Método Rentokil I

Este inseticida contém apenas um princípio ativo, a permetrina, já determinado no método *Aragon I* e *Aragon II*, pelo que não houve necessidade de efetuar os ensaios exploratórios que foi necessário realizar no desenvolvimento dos anteriores métodos.

Utilizaram-se os mesmos equipamentos material e reagentes utilizados no desenvolvimento do método analítico para a determinação de princípios ativos do inseticida *Aragon I*.

Após algumas análises teste, para verificar as massas de princípio ativo a utilizar na solução padrão, chegou-se às seguintes soluções finais:

✓ **Solução Padrão Interno**

Num balão volumétrico de 100 mL pesar 1,0000 g de di-butil ftalato na balança analítica e 99,0000 g de acetona. Agitar a solução

✓ **Solução Padrão**

Pesar 0,1700 g de permetrina na balança analítica para um balão volumétrico de 100 mL. Pipetar 10 mL da solução de padrão interno preparada anteriormente e completar com acetona. Levar a solução à unidade de ultrassons por 5 minutos.

✓ **Solução Amostra**

Pesar aproximadamente 10,0000 g de inseticida na balança analítica para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 10 mL da solução de padrão interno e completar com acetona. Levar a solução à unidade de ultrassons por 5 minutos.

Na Tabela 6.47 constam os caudais de hidrogénio, hélio e ar reconstituído utilizados e, na Tabela 6.48 estão indicados os programas de temperatura usados nos diferentes componentes do cromatógrafo. O tempo de análise para cada solução é de 25 minutos.

Tabela 6.47 - Caudais de hélio, hidrogénio e ar reconstituído utilizados no GC-FID durante a análise das soluções.

Gás	Caudal (mL/min)	Local do GC
Hélio	68,10	Injetor
Hidrogénio	40,00	Detetor
Ar reconstituído	450,0	Detetor

Tabela 6.48 – Condições de temperatura dos componentes do GC-FID.

<b>Injetor</b>	250 °C
<b>Forno</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Inicial: 165 °C</li><li>• Final: 255 °C (manter por 30 minutos)</li><li>• Variação: 3 °C/min</li></ul>
<b>Detetor</b>	300 °C

Depois de se preparar as soluções anteriores procedeu-se à injeção de 1,5 µL da solução padrão e de seguida da solução amostra, estando na Figura 6.14 um exemplo dos cromatogramas registados durante a análise de uma solução padrão do inseticida *Rentokil I*.

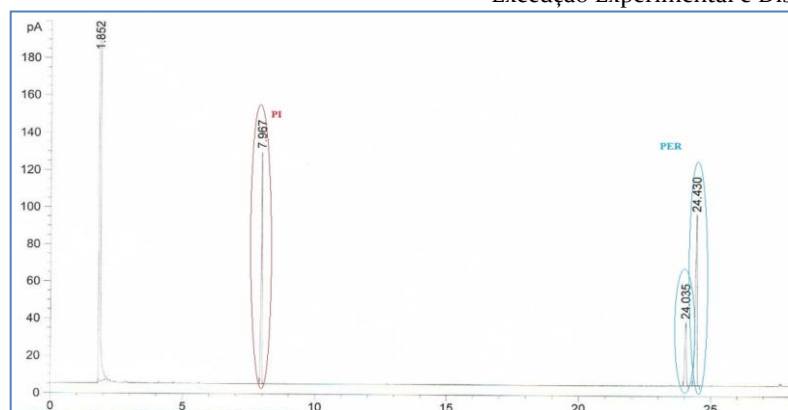


Figura 6.14 – Cromatograma da análise da solução padrão do inseticida *Rentokil I*.

Observa-se então que os tempos de retenção para os dois picos da permetrina são de 24,0 minutos e 24,4 minutos, para o padrão interno o tempo de retenção obtido foi de 7,9 minutos.

As áreas obtidas para os picos da permetrina (considerada como a soma das áreas de todos os isômeros deste princípio ativo) e do padrão interno nas soluções padrão e amostra, assim como as massas utilizadas na preparação das soluções padrão e amostra, nos 10 ensaios realizados, encontram-se representados na Tabela 6.49.

Tabela 6.49 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra, e respectivas áreas dos picos da permetrina e padrão interno nos 10 ensaios realizados

Ensaio	m (PER) (g)	m (inseticida) (g)	Solução Padrão		Solução Amostra	
			Área ISTD	Área PER	Área ISTD	Área PER
1	0,1738	10,0028	477,95	697,70	362,33	86,07
2	0,1720	10,0180	374,63	576,45	393,26	90,37
3	0,1745	10,0060	359,89	581,77	404,10	100,87
4	0,1785	10,0018	307,61	587,16	306,72	81,35
5	0,1781	10,0019	343,16	590,42	358,83	87,88
6	0,1778	10,0081	314,02	587,81	359,51	93,29
7	0,1720	10,0039	359,54	598,42	368,83	90,54
8	0,1790	10,0321	362,12	663,55	353,67	89,37
9	0,1714	10,0261	354,49	586,21	344,92	84,06
10	0,1788	10,0109	426,17	668,43	368,03	86,66

A partir dos resultados das análises efetuadas, foram determinados, utilizando a Equação 5.9, os valores da percentagem de permetrina no inseticida *Rentokil I* e verificou-se que se encontravam dentro das especificações requeridas pelo cliente, tendo-se, por isso, considerado que o método estava desenvolvido. A percentagem da permetrina obtida no inseticida *Rentokil I* nos 10 ensaios realizados, média ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ) encontram-se apresentados na Tabela 6.50.



**Tabela 6.50 – Percentagem da permetrina no inseticida *Rentokil I* nos 10 ensaios efetuados e respetiva média e desvio padrão.**

Ensaio	% PER
1	0,265
2	0,240
3	0,252
4	0,232
5	0,237
6	0,231
7	0,237
8	0,230
9	0,236
10	0,251
$\bar{x}$	0,241
$\sigma$	0,00113

Verifica-se que a média dos valores obtidos experimentalmente encontram-se dentro das especificações do cliente (0,225- 0275) %, apresentado um desvio padrão relativamente baixo o que revela que os resultados experimentais estão pouco dispersos em relação à média.

#### 6.2.3.1. Validação do Método

Conforme foi anteriormente referido, a validação de métodos analíticos compreende a determinação de certos parâmetros estatísticos. Para o método usado na determinação do princípio ativo presente no inseticida *Rentokil I* apenas se vai apresentar o estudo da precisão e exatidão do método, já que não foram realizados os ensaios necessários para a determinação dos restantes parâmetros, uma vez que a validação deste método não constituía objetivo do estágio.

Os erros aleatórios ocorridos ao longo do desenvolvimento dos métodos deverão seguir uma distribuição normal ou de Gauss. Para verificar se isso realmente acontece foi usado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os valores obtidos para o  $D$  experimental e o valor de  $D$  tabelado para um grau de significância de 5 % (ver Anexo V) (Câmara e Silva, 2001) estão registados na Tabela 6.51.

**Tabela 6.51 - Valores de  $D_{exp}$  e  $D_{tab}$  obtidos para a permetrina no método desenvolvido para o inseticida *Rentokil I*.**

Princípio Ativo	$D_{exp}$	$D_{tab}$
PER	0,2394	0,4100

Analisando a tabela anterior, pode-se verificar que a distribuição de frequências observadas para a percentagem de permetrina segue uma distribuição normal, uma vez que o valor de  $D$  tabelado é maior que o valor de  $D$  obtido experimentalmente.

Na Tabela 6.52 encontram-se indicados os valores de mais três parâmetros que traduzem a precisão dos resultados obtidos nos ensaios realizados para a permetrina durante o desenvolvimento do método de análise do inseticida *Rentokil I*: a variância ( $S^2$ ), o desvio padrão médio ( $\sigma_m$ ) e a constante de variância (CV).

**Tabela 6.52 – Variância, desvio padrão médio e coeficiente de variância calculados para os ensaios realizados durante o desenvolvimento do método do inseticida *Rentokil I*.**

Princípio ativo	$S^2$	$\sigma_m$	CV
PER	1,266E-08	0,0036 %	4,67 %

Verifica-se que a percentagem de permetrina no inseticida *Rentokil I* é de  $(0,241 \pm 0,0036)$  %. Ambos os extremos desta gama de frações de permetrina no inseticida (0,247 % e 0,237 %), encontram-se dentro das especificações requeridas pelo cliente. No que diz respeito ao coeficiente de variância, este mostra que em média os desvios relativamente ao valor médio são de 4,67 % para determinações de permetrina no inseticida *Rentokil I*.

Para a análise da exatidão utilizou-se o método do MRC, com as aproximações anteriormente relatadas. Na Tabela 6.53 encontram-se os valores da gama de valores fornecida pelo cliente para a percentagem da permetrina, o valor considerado verdadeiro, a média das frações de princípio ativo obtidas experimentalmente e o erro relativo ( $Er$ ).

**Tabela 6.53 - Gama de valores para a percentagem da permetrina fornecida pelo cliente, valor considerado verdadeiro, média obtida dos valores experimentais ( $\bar{x}$ ) e erro relativo ( $Er$ ) para o inseticida *Rentokil I*.**

Princípio ativo	Gama de fração de princípio ativo (%)	Valor assumido como verdadeiro (%)	$\bar{x}$ (%)	$Er$ (%)
PER	0,225-0,275	0,250	0,241	3,55

Verifica-se que o valor considerado verdadeiro é próximo do valor da média obtida dos valores experimentais para a percentagem de permetrina no inseticida, e também se verifica que o valor do erro relativo é inferior a 5 % mostrando assim que o ensaio é satisfatório.

A averiguação da existência de erros sistemáticos pode ser efetuada através do teste  $t$  da distribuição de *Student*, sendo o valor de  $t$  calculado recorrendo à equação 5.27. Este valor deverá ser comparado com o valor de  $t$  obtido das tabelas de distribuição de *Student*. Na tabela seguinte encontram-se o valor de  $t$  calculado ( $t_{cal}$ ) e o valor de  $t$  retirado das tabelas para um número de ensaios de 10 e nível de significância de 5 % (ver Anexo IV) (Fernandes 1999), para a permetrina no inseticida *Rentokil I*.

**Tabela 6.54 - Valores obtidos para o  $t_{cal}$  e  $t$  das tabelas de distribuição de *Student* para o inseticida *Rentokil I* para os resultados obtidos no desenvolvimento do método.**

Princípio ativo	$ t_{cal} $	$t$
PER	2,493	2,262

De acordo com este parâmetro, o ensaio não seria satisfatório para este inseticida, uma vez que ficou evidenciado estatisticamente a existência de erros sistemáticos, pelo fato de o valor de  $t_{cal}$  ser superior ao valor de  $t$  das tabelas de distribuição de *Student*.

Na avaliação do desempenho do método com base no valor do parâmetro  $Z$ , tal como foi discutido no Capítulo 5, recorre-se à Equação 5.28. Na Tabela 6.55 encontram-se o valor de incerteza associado ao valor assumido como verdadeiro ( $I$ ) desempenho ( $Z$ ) e da percentagem de exatidão, calculados a partir dos resultados obtidos dos ensaios realizados, para o método de análise desenvolvido para a determinação da concentração de princípio ativo no inseticida do cliente *Rentokil I*.

Tabela 6.55 - Valor obtido para o desempenho ( $Z$ ) e *Exatidão* dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do método para o inseticida *Rentokil I*.

Princípio ativo	$I$	$Z$	Exatidão (%)
PER	0,025	0,35	96,45

Embora o método esteja afetado por erros sistemáticos, verifica-se que apresenta um desempenho satisfatório, uma vez que o parâmetro  $Z$  é inferior a 2.

#### 6.2.4. Desenvolvimento Método *Rentokil II*

O inseticida *Rentokil II* contém apenas um princípio ativo, a deltametrina, mas não é a mesma que foi utilizada no método desenvolvimento para os inseticidas do cliente *Sinclair* e do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*. O desenvolvimento deste método foi efetuado nos equipamentos utilizados no desenvolvimento do método do inseticida *Aragon I*.

##### 6.2.4.1. Reagentes e Material

Para se proceder ao desenvolvimento deste método foram necessários vários reagentes, o princípio ativo, o padrão interno e o solvente, na Tabela 6.56 estão representados os reagentes, grau de pureza, riscos e as respetivas medidas de controlo.

Tabela 6.56 – Reagentes utilizados na preparação das soluções.

Reagentes	% Pureza	Risco Significativo	Medida de Controlo
di- <i>n</i> -hexil ftalato (padrão interno)	99,9	Pode causar danos a recém-nascidos, possível risco de comprometer a fertilidade	Usar luvas de nitrilo. Não realizar este teste se estiver grávida
deltametrina (princípio ativo)	1,00	Irritante	Usar luvas de nitrilo. Óculos
acetona (solvente)	98,0	Inflamável, Irritante	Usar óculos e luvas de nitrilo. Manter afastado de fontes de calor

O material de laboratório utilizado para a implementação do método e os seus respectivos erros associados, são indicados de seguida:

- ✓ gobelés - 250 mL
- ✓ balão volumétrico -  $50 \pm 0,06$  mL
- ✓ pipeta volumétrica -  $5 \pm 0,015$  mL
- ✓ pipeta de Pasteur

Após algumas análises teste, para verificar as massas de princípio ativo a utilizar na solução padrão, chegou-se às seguintes soluções finais:

✓ **Solução Padrão Interno**

Num balão volumétrico de 100 mL pesar 1,0000g de di-*n*-hexil ftalato na balança analítica e 99,0000 g de acetona. Agitar a solução.

✓ **Solução Padrão**

Pesar 0,1000 g de deltametrina na balança analítica para um balão volumétrico de 50 mL. Pipetar 5 mL da solução de padrão interno preparada anteriormente e completar com acetona. Levar a solução à unidade de ultrassons por 5 minutos.

✓ **Solução Amostra**

Pesar aproximadamente 7,0000 g de inseticida na balança analítica para um balão volumétrico de 50 mL, adicionar 5 mL da solução de padrão interno e completar com acetona. Levar a solução à unidade de ultrassons por 5 minutos.

Na Tabela 6.57 constam os caudais de hidrogénio, hélio e ar reconstituído utilizados no cromatógrafo e, na Tabela 6.58 estão indicados os programas de temperatura usados nos diferentes componentes do cromatógrafo. O tempo de análise para cada solução é de 25 minutos.

Tabela 6.57 – Caudais de hélio hidrogénio e ar reconstituído utilizados no GC-FID durante a análise das soluções.

Gás	Caudal (mL/min)	Local do GC
Hélio	46,80	Injetor
Hidrogénio	40,00	Detetor
Ar reconstituído	450,0	Detetor

Tabela 6.58 – Condições de temperatura dos componentes do GC-FID.

<b>Injetor</b>	250 °C
<b>Forno</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Inicial: 165 °C</li><li>• Final: 240 °C (manter por 25 minutos)</li><li>• Variação: 3 °C/min</li></ul>
<b>Detetor</b>	250 °C

Depois de se preparar as soluções anteriores procedeu-se à sua injeção de 1,5 µL da solução padrão e de seguida da solução amostra, estando na Figura 6.15 um exemplo dos cromatogramas registados durante a análise de uma solução padrão do inseticida *Rentokil II*.

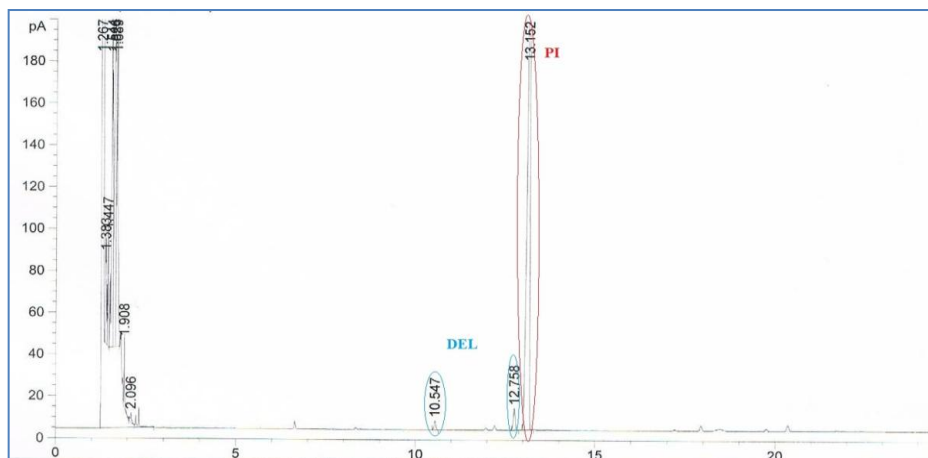


Figura 6.15 – Cromatograma da análise da solução padrão do inseticida *Rentokil II*.

Pode observar-se que os tempos de retenção para os dois picos da deltametrina são de 10,5 minutos e de 12,7 minutos, enquanto que para o padrão interno é de 13,1 minutos.

As áreas obtidas para os picos da deltametrina, tendo em conta que a área de cada princípio ativo e a soma de todos os picos obtidos para esse princípio ativo, e do padrão interno na solução padrão e na solução amostra, assim como as massas utilizadas na preparação das soluções padrão e amostra, nos 10 ensaios realizados encontram-se representados na Tabela 6.59.

Tabela 6.59 – Massas usadas na preparação das soluções padrão e amostra, e respetivas áreas dos picos da deltametrina e padrão interno nos 10 ensaios realizados.

Ensaio	m (deltametrina) (g)	m (inseticida) (g)	Solução Padrão		Solução Amostra	
			Área ISTD	Área DEL	Área ISTD	Área DEL
1	0,1012	7,0193	1261,91	47,74	1476,40	125,16
2	0,1077	7,0077	1222,51	49,88	1422,61	122,33
3	0,1021	7,0058	1148,71	42,51	1470,91	125,82
4	0,1090	7,0088	1219,93	49,68	1453,22	124,49
5	0,1073	7,0174	1360,48	55,10	1466,06	125,74
6	0,1004	7,0186	1358,93	52,27	1438,96	134,28
7	0,1074	7,0198	1275,18	49,71	1491,15	127,58
8	0,1113	7,0190	1314,49	53,83	1478,91	125,52
9	0,1049	7,4376	1359,20	52,76	1459,76	133,39
10	0,1028	7,5332	1337,76	52,15	1418,83	131,04

A partir dos resultados das análises efetuadas, foram determinados, utilizando a Equação 5.9, os valores da percentagem de deltametrina no inseticida *Rentokil II*. Verificou-se que se encontravam dentro das especificações requeridas pelo cliente, tendo-se, por isso, considerado que o método estava desenvolvido. A percentagem da deltametrina obtida no inseticida *Rentokil II* nos 10 ensaios realizados, bem como a média ( $\bar{x}$ ) e o desvio padrão ( $\sigma$ ), encontram-se apresentados na Tabela 6.60.

**Tabela 6.60 - Percentagem da deltametrina no inseticida *Rentokil II* nos 10 ensaios efetuados e respetiva média e desvio padrão.**

Ensaio	% DEL
1	0,0323
2	0,0324
3	0,0337
4	0,0327
5	0,0324
6	0,0347
7	0,0336
8	0,0329
9	0,0332
10	0,0323
$\bar{x}$	0,0330
$\sigma$	0,000784

A média dos valores obtidos experimentalmente encontra-se dentro das especificações requeridas pelo cliente (0,0316-0,0350) %, o desvio padrão obtido neste método é pequeno mostrando assim que os valores obtidos não se dispersam muito em relação à média.

#### 6.2.4.2. Validação do Método

Como já foi referido anteriormente não é possível fazer um estudo completo para a validação deste método, pelo que uma vez mais, apenas se poderá validar os critérios de precisão e exatidão do método.

Os erros aleatórios ocorridos ao longo do desenvolvimento dos métodos deverão seguir uma distribuição normal ou de Gauss. Para verificar se isso realmente acontece foi usado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* (ver Anexo V). Os valores obtidos para o  $D$  experimental e de  $D$  tabelado para um grau de significância de 5 % (Câmara e Silva, 2001) estão registados na Tabela 6.61.

**Tabela 6.61 - Valores de  $D_{exp}$  e de  $D_{tab}$  para cada princípio ativo do método do inseticida *Rentokil II*.**

Princípio ativo	$D_{exp}$	$D_{tab}$
DEL	0,1865	0,4100

Verifica-se que o valor de  $D$  tabelado é maior que o valor  $D$  obtido experimentalmente, mostrando assim que os valores experimentais para a percentagem de deltametrina no inseticida *Rentokil II* seguem uma distribuição normal.

Na Tabela 6.62 encontram-se indicados os valores de mais três parâmetros que traduzem a precisão dos resultados obtidos nos ensaios realizados para a deltametrina durante o desenvolvimento do método de análise do inseticida *Rentokil II*: a variância ( $S^2$ ), o desvio padrão médio ( $\sigma_m$ ) e a constante de variância (CV).

**Tabela 6.62 – Variância, desvio padrão médio e coeficiente de variância calculados para os ensaios realizados durante o desenvolvimento do método do inseticida *Rentokil II*.**

Princípio ativo	$S^2$	$\sigma_m$	CV
DEL	6,145E-11	0,000248 %	2,374 %

Este método é bastante preciso, comparado com os restantes métodos desenvolvidos, pois apresenta um desvio padrão médio e um coeficiente de variância muito reduzidos, evidenciando uma baixa dispersão dos resultados obtidos experimentalmente em relação à média.

Para a análise da exatidão utilizou-se o método do MRC, com as aproximações anteriormente relatadas. Na Tabela 6.63 encontram-se os valores da gama de valores fornecida pelo cliente para a deltametrina, o valor considerado verdadeiro, a média dos valores da percentagem de princípio ativo neste inseticida obtidos experimentalmente e o erro relativo ( $Er$ ).

**Tabela 6.63 - Gama de valores de percentagem da deltametrina fornecida pelo cliente, valor considerado verdadeiro, média obtida dos valores experimentais ( $\bar{x}$ ) e erro relativo ( $Er$ ) para o inseticida *Rentokil II*.**

Princípio ativo	Gama de fração de princípio ativo (%)	Valor assumido como verdadeiro (%)	$\bar{x}$ (%)	$Er$ (%)
DEL	0,0316-0,035	0,0333	0,0330	0,85

Observa-se uma grande aproximação entre o valor considerado verdadeiro e o valor médio obtido dos ensaios experimentais.

Na averiguação da existência de erros sistemáticos através do teste  $t$  de *Student*, determinou-se o valor de  $t$  calculado recorrendo à equação 5.27, que deverá ser comparado com o valor de  $t$  obtido das tabelas de distribuição de *Student*. Na tabela seguinte encontram-se os valores de  $t$  calculado ( $t_{cal}$ ) e o valor de  $t$  retirado das tabelas para um número de ensaios de 10 e nível de significância de 0,5 % (Fernandes, 1999), para o princípio ativo deltametrina no inseticida *Rentokil II*.

**Tabela 6.64 - Valores obtidos para o  $t_{cal}$  e  $t$  das tabelas de distribuição de *Student* para o inseticida *Rentokil II* para os resultados obtidos no desenvolvimento do método.**

Princípio ativo	$ t_{cal} $	$t$
DEL	1,148	2,262

Verifica-se que o ensaio é satisfatório uma vez que o valor de  $t_{cal}$  é menor que o valor de  $t$  das tabelas de distribuição de *Student*, mostrando assim que não ficou estatisticamente evidenciado a existência de erros sistemáticos.

Na avaliação do desempenho do método com base no valor do parâmetro  $Z$ , recorre-se à Equação 5.28. Na Tabela 6.65 encontram-se o valor de incerteza associado ao valor assumido como verdadeiro ( $I$ ), desempenho ( $Z$ ) e da percentagem de exatidão, calculados a partir dos resultados obtidos dos ensaios realizados, para o método de análise desenvolvido para a determinação da concentração de princípio ativo no inseticida do cliente *Rentokil II*.

**Tabela 6.65 - Valor obtido para o desempenho ( $Z$ ) e Exatidão dos resultados obtidos durante o desenvolvimento do método para o inseticida *Rentokil II*.**

<b>Princípio ativo</b>	<b><math>I</math></b>	<b><math>Z</math></b>	<b>Exatidão (%)</b>
DEL	0,0017	0,17	99,15

O fator de desempenho deste método de análise é bastante satisfatório, pois o valor de  $Z$  é inferior a 2, e por sua vez o valor da exatidão é muito próxima de 100 %.



## 7. CONCLUSÃO

O estágio desenvolvido na COLEP teve como principal objetivo o desenvolvimento de métodos de quantificação de princípios ativos presentes em inseticidas através de cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama. Pretendeu-se, ainda, efetuar a validação de alguns dos métodos desenvolvidos, recorrendo à determinação de parâmetros de validação de métodos analíticos em estudo como: a gama de trabalho/linearidade, os limites de detecção e de quantificação, a sensibilidade, a precisão e a exatidão.

Procedeu-se ao desenvolvimento de dois métodos de quantificação da deltametrina em dois inseticidas diferentes, o do cliente *Sinclair* e o do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*. Obteve-se uma percentagem média experimental de deltametrina no inseticida do cliente *Sinclair* de  $(0,0330 \pm 0,0003045) \%$  e de  $(0,0318 \pm 0,001105) \%$  no inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*, valor que se encontra fora das especificações requeridas  $(0,0257-0,0315) \%$ , denotando assim alguma limitação no método desenvolvido.

No âmbito da validação dos métodos foi realizado o estudo da gama de trabalho, tendo-se verificado que esta não era adequada, uma vez que o valor de *PG* calculado a partir dos resultados obtidos experimentalmente era superior ao valor da tabela de *Snedecor/Fisher* para um nível de significância de 5 %. Apesar de os resultados demonstrarem que a gama de trabalho deveria ser diminuída, optou-se por não o fazer face ao reduzido número de réplicas da solução padrão considerado e à impossibilidade de repetir os ensaios de forma completa.

Para o estudo da linearidade dos métodos foram ajustadas duas curvas de calibração aos resultados obtidos da análise das soluções padrão, uma função linear (do 1º grau) e um polinómio do 2º grau, observando-se que as funções de ajuste usadas originam curvas de calibração sobreponíveis, mostrando que, para a gama de concentrações usadas existe uma relação linear entre a razão das áreas e a concentração de analito utilizada. Foi também calculado o valor de *PG* e comparado com o valor de *Snedecor/Fisher* tabelado, e conclui-se mais uma vez a linearidade do método uma vez que o valor de *PG* é menor que o valor tabelado de *F* para um nível de significância de 5 %, sendo de 00009906 e 18,51 respetivamente.

O limite de detecção e o limite de quantificação obtido para os métodos foi de 1,03 g/L e 3,13 g/L respetivamente, concluindo-se que o método deteta a deltametrina para concentrações iguais ou superiores a 1,03 g/L e que para se obter boas exatidões e precisões é necessário uma concentração de deltametrina de 3,13 %.

A análise da precisão de ambos os métodos foi efetuada analisando os resultados experimentais de cada um dos inseticidas, através da análise da distribuição normal, desvio padrão e desvio de padrão médio, coeficiente de variância e variância. Pôde-se concluir, através da aplicação do teste *Kolmogorov-Smirnov*, que o método desenvolvido para o inseticida do cliente *Sinclair* segue uma melhor distribuição normal que o método desenvolvido para o inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*, uma vez que o valor de *D* obtido experimentalmente é maior para este último inseticida (0,3211 e 0,1352,

respetivamente). O desvio de padrão, desvio de padrão médio e variância são bastante maiores para os resultados obtidos experimentalmente para o inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals*, mostrando assim que os resultados experimentais encontram-se bastante mais dispersos que no método do inseticida do cliente *Sinclair*. O coeficiente de variância apresenta valores de 2,920 %, e de 10,48 %, para os métodos da análise de inseticida dos clientes *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*, respetivamente, demonstrando que o método do inseticida do cliente *Sinclair* é mais preciso.

Para avaliar a exatidão dos métodos determinou-se o erro relativo e a percentagem de exatidão, e avaliou-se a eventual existência de erros sistemáticos. Conclui-se que o método mais exato é o método desenvolvido para a análise do inseticida do cliente *Sinclair*, uma vez que, contém um baixo erro relativo e uma elevada de exatidão, 1,010% e 98,99 % respetivamente. No método desenvolvido para a análise do inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals* os valores obtidos são de 11,10 % e 111,10 % respetivamente, e verificou-se, ainda, que o método possui associados erros sistemáticos, uma vez que o valor de *t* obtido experimentalmente é maior que o valor de *t* retirado das tabelas de *Student* para um nível de significância de 5 %. Conclui-se, pois, que o método desenvolvido para a análise do inseticida do cliente *Sinclair* apresenta um desempenho melhor que o do método do inseticida do cliente *Gerhardt Pharmaceuticals*.

Durante o estágio houve, ainda, necessidade de desenvolver outros métodos de análise para determinação dos princípios ativos presentes nos inseticidas identificados como: *Aragon I* (quatro princípios ativos), *Aragon II* (cinco princípios ativos), *Rentokil I* e *Rentokil II* (com um princípio ativo cada um).

Para o método desenvolvido para o inseticida *Aragon I* obteve-se uma média experimental de butóxido de piperonilo de  $(0,613 \pm 0,0076)$  % de neopinamina de  $(0,188 \pm 0,0103)$  %, de permetrina de  $(0,422 \pm 0,0124)$  % e de cipermetrina de  $(0,385 \pm 0,0185)$  %, estando somente a percentagem de permetrina fora das especificações requeridas pelo cliente, que são de  $(0,360 - 0,400)$  %. Para o método desenvolvido para o inseticida *Aragon II* obteve-se uma média experimental de butóxido de piperonilo de  $(0,910 \pm 0,0295)$  % de neopinamina de  $(0,283 \pm 0,0062)$  %, de permetrina de  $(0,388 \pm 0,0085)$  %, de cipermetrina de  $(0,423 \pm 0,0306)$  % e de bendiocarbe de  $(0,740 \pm 0,0357)$  %, estando somente a percentagem de cipermetrina fora das especificações requeridas pelo cliente, que são de  $(0,450 - 0,550)$  %. O método desenvolvido para o inseticida *Rentokil I* contém apenas um princípio ativo a permetrina, obtendo uma média de percentagem experimental de  $(0,241 \pm 0,0036)$  %, encontrando-se dentro das especificações do cliente  $(0,225 - 0,275)$  %. O método desenvolvido para o inseticida *Rentokil II* contém também um princípio ativo, a deltametrina, obtendo uma média de percentagem experimental de  $(0,0330 \pm 0,000248)$  %, encontrando-se dentro das especificações do cliente  $(0,0316 - 0,035)$  %.

No que diz respeito à precisão e exatidão destes métodos conclui-se que o método mais exato e mais preciso é o método de análise desenvolvido para o inseticida do cliente *Rentokil*

*II*, com valor de erro relativo, exatidão e de desempenho de 0,85 %, 9915 % e 0,17, não contendo associado nem erros aleatórios nem sistemáticos.

Entre os princípios ativos dos inseticidas *Aragon I* conclui-se que para todos os erros seguem uma distribuição normal, somente para o butóxido de piperonilo o ensaio foi satisfatório, uma vez que foi o único com um erro relativo menor que 5%. Ficou evidenciado estatisticamente a existência de erros sistemáticos para o princípio ativo permetrina, e, também para este princípio ativo, foi considerado que o método é questionável, uma vez que o valor de desempenho foi maior que 2, conclui-se também que o butóxido de piperonilo é o princípio ativo cujo método é mais exato com uma exatidão de 102,90 %.

Entre os princípios ativos dos inseticidas *Aragon II* conclui-se que para todos os erros seguem uma distribuição normal, somente para a permetrina o ensaio foi satisfatório, uma vez que foi o único com um erro relativo menor que 5%. Ficou evidenciado estatisticamente a existência de erros sistemáticos para os princípios ativos butóxido de piperonilo, neopinamina e cipermetrina, uma vez que o valor de *t* calculado experimentalmente é maior que o valor de *t* retirado das tabelas de *Student*, todos os princípios ativos obtiveram um bom desempenho, sendo a permetrina o princípio ativo mais exato com 102,62 %.

Conclui-se portanto que para a validação de métodos seria necessário bastantes mais ensaios e um estudo mais aprofundado dos parâmetros de validação, mostrando assim a importância da rigorosidade destes parâmetros, poder-se-ia também efetuar análises num outro laboratório para assim se verificar a exatidão dos métodos desenvolvidos, alterando também para isso o operador, para assim verificar a existência, ou não, de erros.

De futuro seria necessário efetuar novamente o estudo da validação dos métodos analíticos desenvolvido para os inseticidas do cliente *Sinclair* e *Gerhardt Pharmaceuticals*, uma vez que os resultados não permitiram tirar conclusões exatas, também o detetor utilizado para o desenvolvimento destes métodos apresenta várias limitações para moléculas como as dos inseticidas, portanto seria interessante comparar os resultados obtidos com outro tipo de detetor, como o GC-MS, bastante utilizado em análises deste tipo.

No que diz respeito ao estágio realizado na empresa COLEP, este foi bastante importante, uma vez que serviu para a integração numa empresa, conhecimento de práticas de trabalho, trabalho em equipa, das etapas de produção de aerossóis e o seu enchimento, e acima de tudo, da responsabilidade do desenvolvimento de novos métodos de análise cromatográfica, e do funcionamento do cromatógrafo gasoso de ionização de chama.



## 8. BIBLIOGRAFIA

Abad, F. (2006). *Determinação multirresíduo de pesticidas em cenouras utilizando extração com líquido pressurizado e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas*. Pós-Graduação, Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Química, Rio Grande do Sul.

Agência Portuguesa do Ambiente (2011). *Licença Ambiental nº 405*. Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território.

AgrEvo Environmental Health (1995). *Aerosol insecticides :a technical review*. D-65926 Frankfurt am Main, Alemanha.

Almeida, R. (2010). *Lean Manufacturing: melhorar o desempenho de linhas de produção*. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia e Gestão Industrial da Universidade de Aveiro, Aveiro.

Alves, F. (2005). *Pesquisa de Pesticidas Organoclorados em Sedimentos e Rizo-sedimentos do Estuário do Rio Douro*. Tese de Mestrado, Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.

Agilent Technologies (2002). *Fundamentals of Gas Chromatography*. G1176-90000, Agilent Technologies, USA.

Augusto, C. (2011). *Validação de Metodologia Analítica para a Determinação da Composição Química do Gás Natural por Cromatografia em Fase Gasosa Aliada à Estimativa dos Parâmetros de Precisão através de Comparação Laboratorial*. Pós-graduação, Departamento de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Barbosa, S. (2012). *Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD*. Tese de Mestrado, Departamento de Biologia Humana e Ambiente da Faculdade de Ciências Universidade de Lisboa, Lisboa.

Bhanu, S., Archana, S., Ajay, K., Bhatt, J.L., Singh, P. e Vandana, B. (2010). *Impact of deltamethrin on environment use as na insecticide and its bacterial degradation-A preliminar study*. International Journal of environmental sciences Volume 1, Nº 5.

Câmara, Filipe e Silva, Oslavo (2001). *Estatística não Paramétrica: Testes de hipóteses e medidas de associação*. Monografia, Departamento de Matemática da Universidade dos Açores, Ponta Delgada.

Colep (2013). [www.colep.com](http://www.colep.com). Portugal.

COLEP Portugal SA (2012). *Relatório de Contas Consolidado 31 de Dezembro de 2012*. Vale de Cambra.

Diário da República (2010). *Decreto-Lei nº 61/2010*. Ministério da Economia, da Inovação e do Desenvolvimento. 1ª Série –Nº 111.

- Eith, C., Kolob, M., Rumi, A., Seubert, A. e Viehweger, K. (2006). *Práticas em Cromatografia de íons. Uma Introdução*. Metrohm Ltda., Suíça.
- Elliott, M. e Janes, N. (1979). *Advances in Pesticides Science*. Pergamon Press; New York.
- Environmental Health Criteria (1997). *Deltamethrin*. International Programme on Chemical Safety.
- Fernandes, Edite (1999). *Estatística Aplicada*. Universidade do Minho, Braga.
- Fernandes, S. (2010). *Desenvolvimento de um método de análise de Pesticidas na Indústria Vitivinícola*. Tese de Mestrado, Departamento de Química da Universidade do Minho, Minho.
- Ferreira, C. (2010). *Validação do Método de Determinação de Butóxido de Piperonilo, Permetrina e Piretrina em Inseticidas por Cromatografia em Fase Gasosa*. Tese de Mestrado, Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Fonseca, Isabel M. A. (2004) *Erros Experimentais – Uma abordagem pedagógica*. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, nº95.
- Gilbert, S. (2012). *A small dose of Toxicology the Health Effects of Common Chemical*. Healthy World Press, EUA.
- Gonçalves, A. (2012). *Balanced Scorecard and Demand Standards na Colep*. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Industrial e de Gestão da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto.
- Gonçalves, M. (1996). *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Hinds, W. (1999). *Aerosol Technology, Properties, behavior and measurement of airborne particles*. John Wiley e Sons Inc.. Canada.
- IARC (1991). *Occupational Exposures in Insecticides Application, and some Pesticides*. International Agency for Research on Cancer. Vol.53, pp. 252-263.
- Jornal de Negócios (2010). [http://www.jornaldenegocios.pt/empresas/detalhe/portuguesa\\_colepccl\\_abre\\_faacutebrica\\_n\\_o\\_brasil.html](http://www.jornaldenegocios.pt/empresas/detalhe/portuguesa_colepccl_abre_faacutebrica_n_o_brasil.html). Jornal de Negócios (www.jornaldenegocios.pt), Portugal.
- Johnson, M.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. (2010). Deltamethrin Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services.
- Kitson, F., Sparkman, D. e Penton, Z (1996) *Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A practical guide*. Academy Press, New York.
- Leite, S. (2013) . Apresentação cedida pela D.Susana Leite, Colep.
- Lucas, D. (2008). *Aumento da Capacidade da Litografia*. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto

- Montanha, F. e Pimpão, C. (2012). *Efeitos Toxicológicos de Piretróides em Peixes*. Revista Científica Electronica de Medicina Veterinária, Número 18, ISSN 1679-7353.
- Pavan, F., Dallago, R., Zanella, R. e Martins, A. (1999). *Determination of deltamethrin in cattle dipping baths by high-performance liquid chromatography*. J. Agric. Food Chem, vol.47, pp.174-176.
- Pereira, I. (2008). *Lean Transformation – Linha de enchimento de aerossóis A1 na ColepCCL*. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Industrial de Gestão da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto.
- Pérez-Fernández, V., Garcia, M. e Marina, M. (2010). *Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids*, Journal of Chromatography A, p. 968-989.
- RELACRE, Guia RELACRE 13. (2000). *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. RELACRE.
- RELACRE, Guia RELACRE 3. (1996). *Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*. RELACRE.
- Robert L. e Eugene, F. (2004); *Modern Practice of gas Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Rodobiko Hirata (1994), *Piretroídes: Estrutura química – Actividade biológica*. Química Nova, Vol.18, nº4, pp. 368-374.
- Sagape, J. (2009). *Gestão de Desperdício de Materiais*. Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto.
- Santos, M., Areas, M. e Reyes, F. (2007); *Piretróides - Uma Visão Global*, Alim. Nutr., Araraquara, v.18, n.3, p. 339-349.
- Santos, S. (2001). *A Química dos Inseticidas (parte I e parte II)*. Boletim SPQ Química dos Inseticidas. pp:37-41;43-47.
- Scott, R. (2003), *Principles and Practice of Chromatography*, Libraryforscience,LLC, World Wide Web.
- Skoog, D.A., Weste, D.M., Holler, F.J. e Crouch, S.R. (2004). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Brooks/Cole, Belmont.
- Silva, R. (2011). *Levantamento, Mapeamento e Avaliação dos Processos da Cadeia de Fornecimento na ColepCCL*. Tese Mestrado, Departamento de Engenharia Industrial e de Gestão da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto.
- Silva, I. (2009). *Análise de pesticidas na polpa e casca de frutas para sumo*. Tese de Mestrado, Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Aveiro.
- Thompson, M., Lowthian, P.J. (2011). *Notes on statistics and data quality for analytical chemists*. Imperial College Press, London.
- Vilarinho, Fernanda (2011). *Pesticidas*, Instituto Nacional de Saúde.

Wenclawiak, B. Otterbach, A. (2000), *Carbon-based quantitation of pyrethrins by supercritical-fluid chromatography*, Journal of biochemical and biophysical methods, Alemanha, 197-207

.



**ANEXOS**

**I- Protocolo entregue pela empresa COLEP para a determinação da deltametrina no inseticida *Sinclair* e inseticida *Gerhardt Pharmaceuticals***


<b>INSTRUÇÃO DE CONTROLO E INSPECÇÃO</b>
<b>Determinação da Deltametrina em Inseticidas – T14.L099</b>

**1- Revisão do método**

Edição	Descrição	Data emissão	Data efetiva
001	Nova Edição		
002	Revisão do Logótipo		

**2- Objetivo**

Determinação da deltametrina em inseticidas.

**3- Campo de aplicação**

Esta instrução técnica é aplicável ao “Product Supply Group”.

**4- Definições**

n/a.

**5- Referências**

n/a.

**6- Responsabilidade**

A responsabilidade pela realização desta Instrução é do Departamento de Qualidade.

**7- Descrição do procedimento**

**7.1- Reagentes e Segurança, Equipamento e Material**

**7.2- Reagentes e Segurança**

Reagentes	Risco significativo	Medida de Controlo
Di-n-hxyl phthalate (padrão interno)	Pode causar danos a recém nascidos, possível risco de comprometer a fertilidade.	Usar luvas de nitrilo. Não realizar este teste se estiver grávida.
Deltametrina	Irritante	Usar luvas de nitrilo, Óculos

Acetona	Inflamável, Irritante	Usar óculos e luvas. Manter afastado de fontes de calor.
---------	-----------------------	--

### 7.1.2- Equipamento e Material

- GC/FID
- 1 x 250 mL gobelé
- 1 x 100 mL balão volumétrico
- 2 x 50 mL balão volumétrico
- 1 x 5 mL pipeta
- 1 x 1µL micro seringa
- 1 x 1 pipeta de Pasteur
- Balança Analítica
- Ultrassom

### 7.2- Duração do ensaio

A duração é de aproximadamente 2h.

### 7.2- Método

#### Preparação da Solução Padrão-Interno

- Num balão volumétrico de 100 mL pesar 1,0000 g de Di-n-hexylphthalate numa balança analítica e 99,0000 de Acetona.
- Agite a solução e guarde num frasco de vidro.

#### Preparação da Solução Padrão (A)

- Num balão volumétrico de 50 mL pesar 0,10000 g de Deltametrina;
- Pipetar 5 mL da Solução Padrão Interno;
- Completar com Acetona e homogeneize a solução no ultrassom.

#### Preparação da Solução Amostra (A)

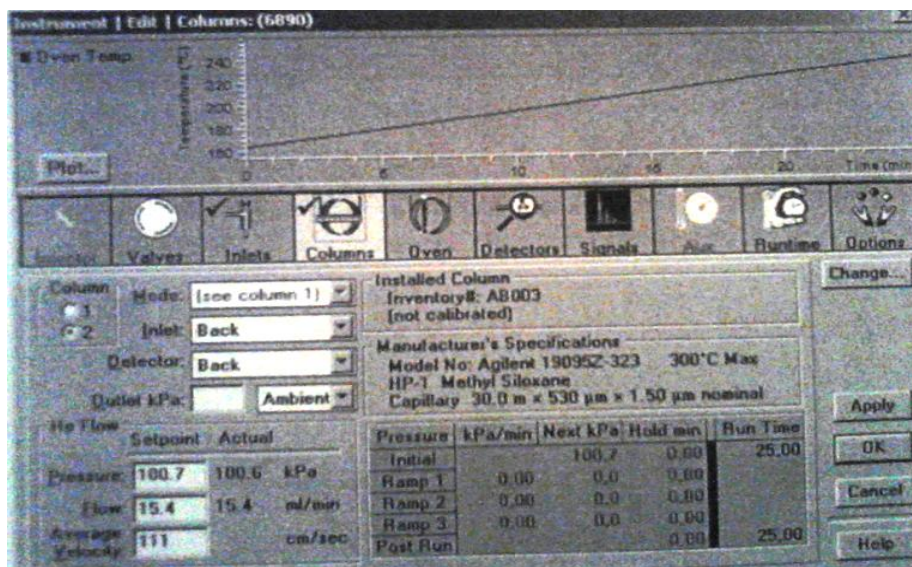
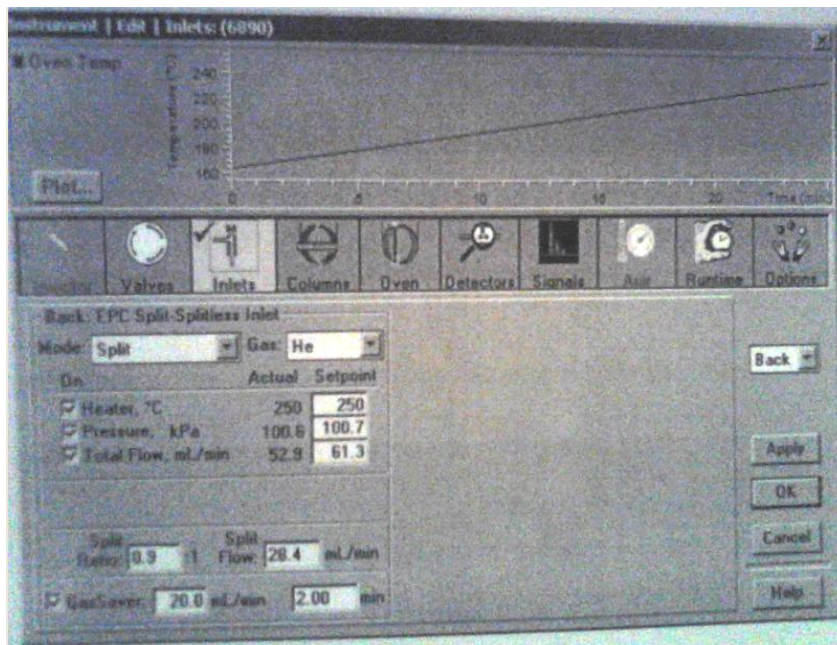
- Pesar aproximadamente 23,0000 g de inseticida num balão volumétrico de 50 mL, e adicione 5 mL da Solução de Padrão Interno e complete com Acetona;
- Homogeneizar a solução e levar ao ultrassom.

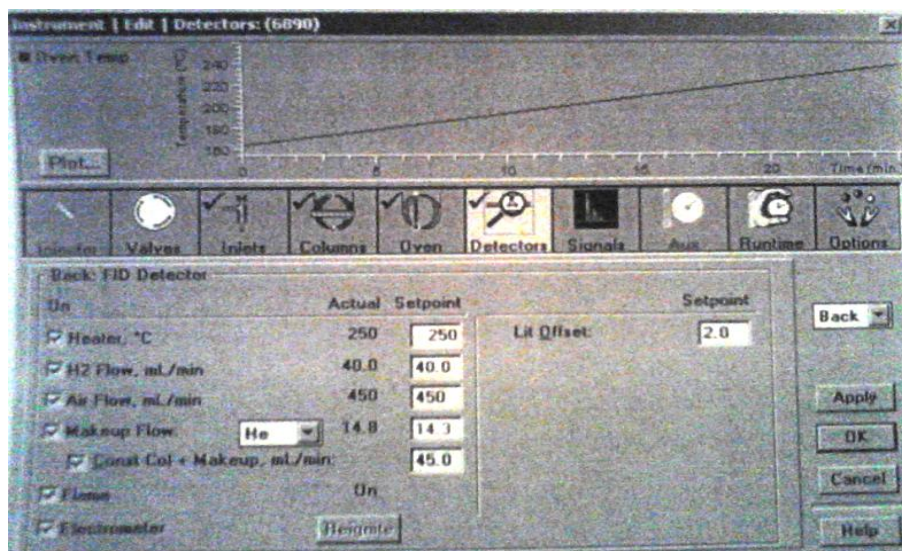
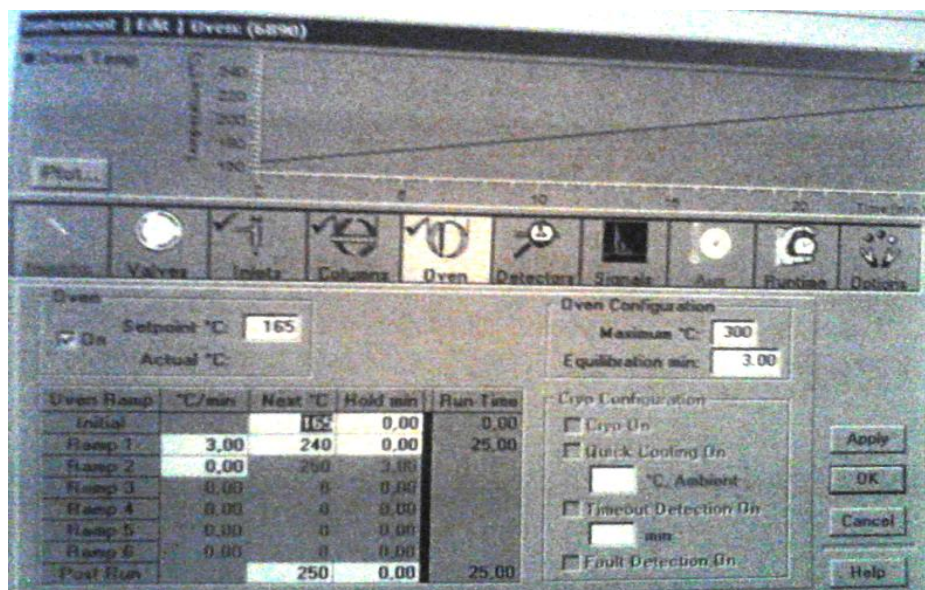
### Notas:

A deltametrina tem um pico com tempo de retenção aos 10,2 minutos.

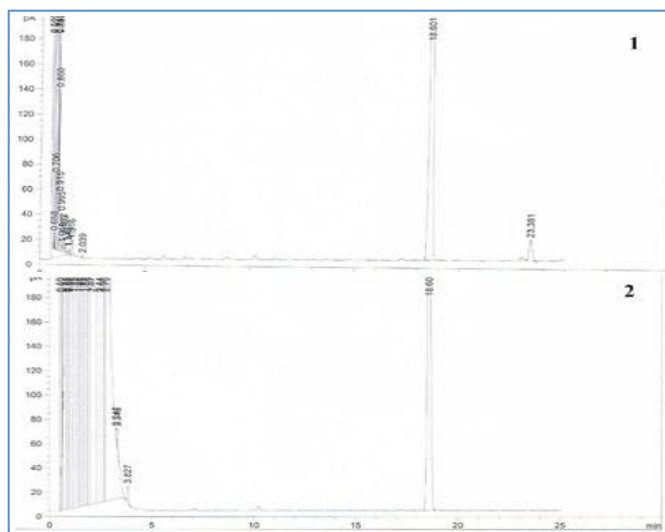
O padrão interno tem um tempo de retenção aos 18,6 minutos.

Condições do GC-FID:

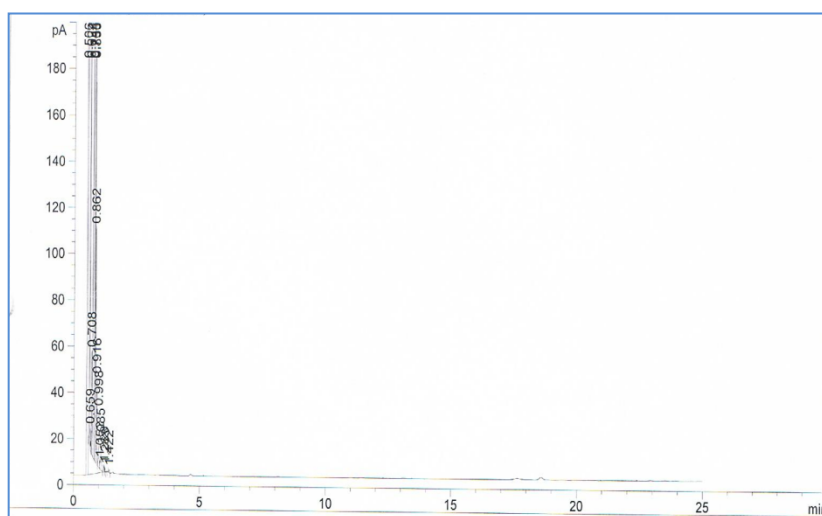




## II- Cromatograma obtido de dois ensaios realizados (1.Solução padrão, 2.Solução amostra)







**IV – Distribuição F de Snedecor com grau de significância de 5 % (Fernandes, 1999).**

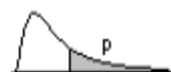


Tabela A.9: Valores Críticos da distribuição F-Fisher

<i>g.l.1</i>	<i>g.l.2</i>	<b>0,1</b>	<b>0,05</b>	<b>0,025</b>	<b>0,01</b>	<b>0,001</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	39,86	161,45	647,79	4052,18	405311,58
	<b>2</b>	8,53	18,51	38,51	98,50	998,38
	<b>3</b>	5,54	10,13	17,44	34,12	167,06
	<b>4</b>	4,54	7,71	12,22	21,20	74,13
	<b>5</b>	4,06	6,61	10,01	16,26	47,18
	<b>6</b>	3,78	5,99	8,81	13,75	35,51
	<b>7</b>	3,59	5,59	8,07	12,25	29,25
	<b>8</b>	3,46	5,32	7,57	11,26	25,41
	<b>9</b>	3,36	5,12	7,21	10,56	22,86
	<b>10</b>	3,29	4,96	6,94	10,04	21,04
	<b>11</b>	3,23	4,84	6,72	9,65	19,69
	<b>12</b>	3,18	4,75	6,55	9,33	18,64
	<b>13</b>	3,14	4,67	6,41	9,07	17,82
	<b>14</b>	3,10	4,60	6,30	8,86	17,14
	<b>15</b>	3,07	4,54	6,20	8,68	16,59
	<b>16</b>	3,05	4,49	6,12	8,53	16,12
	<b>17</b>	3,03	4,45	6,04	8,40	15,72
	<b>18</b>	3,01	4,41	5,98	8,29	15,38
	<b>19</b>	2,99	4,38	5,92	8,18	15,08
	<b>20</b>	2,97	4,35	5,87	8,10	14,82
	<b>21</b>	2,96	4,32	5,83	8,02	14,59
	<b>22</b>	2,95	4,30	5,79	7,95	14,38
	<b>23</b>	2,94	4,28	5,75	7,88	14,20
	<b>24</b>	2,93	4,26	5,72	7,82	14,03
	<b>25</b>	2,92	4,24	5,69	7,77	13,88
	<b>26</b>	2,91	4,23	5,66	7,72	13,74
	<b>27</b>	2,90	4,21	5,63	7,68	13,61
	<b>28</b>	2,89	4,20	5,61	7,64	13,50
	<b>29</b>	2,89	4,18	5,59	7,60	13,39
	<b>30</b>	2,88	4,17	5,57	7,56	13,29
	<b>40</b>	2,84	4,08	5,42	7,31	12,61
	<b>50</b>	2,81	4,03	5,34	7,17	12,22
	<b>60</b>	2,79	4,00	5,29	7,08	11,97
	<b>100</b>	2,76	3,94	5,18	6,90	11,50
	<b>200</b>	2,73	3,89	5,10	6,76	11,15
	<b>1000</b>	2,71	3,85	5,04	6,66	10,89

**V – Valores críticos de D no teste *Kolmogorov-Smirnov* (Câmara e Silva, 2001)**

N	Nível de Significância para $D = \max F_0(X) - S_N(X) $				
	0,20	0,15	0,10	0,05	0,01
1	0,900	0,925	0,950	0,975	0,995
2	0,684	0,726	0,776	0,842	0,929
3	0,565	0,597	0,642	0,708	0,828
4	0,494	0,525	0,564	0,624	0,733
5	0,446	0,474	0,510	0,565	0,669
6	0,410	0,436	0,470	0,521	0,618
7	0,381	0,405	0,438	0,486	0,577
8	0,358	0,381	0,411	0,457	0,543
9	0,339	0,360	0,388	0,432	0,514
10	0,332	0,342	0,368	0,410	0,490
11	0,307	0,326	0,352	0,391	0,468
12	0,295	0,313	0,338	0,375	0,450
13	0,284	0,302	0,325	0,361	0,433
14	0,274	0,292	0,314	0,349	0,418
15	0,266	0,283	0,304	0,338	0,404
16	0,258	0,274	0,295	0,328	0,392
17	0,250	0,266	0,286	0,318	0,381
18	0,244	0,259	0,278	0,309	0,371
19	0,237	0,252	0,272	0,301	0,363
20	0,231	0,246	0,264	0,294	0,356
25	0,21	0,22	0,24	0,27	0,32
30	0,19	0,20	0,22	0,24	0,29
35	0,18	0,19	0,21	0,23	0,27
Mais de 35	$\frac{1,07}{\sqrt{N}}$	$\frac{1,14}{\sqrt{N}}$	$\frac{1,22}{\sqrt{N}}$	$\frac{1,36}{\sqrt{N}}$	$\frac{0,63}{\sqrt{N}}$

**Anexo VI – Distribuição *t* de Student (Fernandes, 1999).**

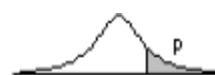


Tabela A.8: Valores Críticos da distribuição t-student

$\begin{matrix} \alpha \\ \downarrow \\ P \rightarrow \end{matrix}$	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	0,025	0,02	0,01	0,005	0,0005
1	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	15,894	31,821	63,656	636,578
2	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	4,849	6,965	9,925	31,600
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	3,482	4,541	5,841	12,924
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	2,999	3,747	4,604	8,610
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	2,757	3,365	4,032	6,869
6	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	2,612	3,143	3,707	5,959
7	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,517	2,998	3,499	5,408
8	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,449	2,896	3,355	5,041
9	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,398	2,821	3,250	4,781
10	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,359	2,764	3,169	4,587
11	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,328	2,718	3,106	4,437
12	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,303	2,681	3,055	4,318
13	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,282	2,650	3,012	4,221
14	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,264	2,624	2,977	4,140
15	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,249	2,602	2,947	4,073
16	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,235	2,583	2,921	4,015
17	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,224	2,567	2,898	3,965
18	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,214	2,552	2,878	3,922
19	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,205	2,539	2,861	3,883
20	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,197	2,528	2,845	3,850
21	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,189	2,518	2,831	3,819
22	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,183	2,508	2,819	3,792
23	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,177	2,500	2,807	3,768
24	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,172	2,492	2,797	3,745
25	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,167	2,485	2,787	3,725
26	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,162	2,479	2,779	3,707
27	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,158	2,473	2,771	3,689
28	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,154	2,467	2,763	3,674
29	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,150	2,462	2,756	3,660
30	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,147	2,457	2,750	3,646
40	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,123	2,423	2,704	3,551
50	0,679	0,849	1,047	1,299	1,676	2,009	2,109	2,403	2,678	3,496
80	0,678	0,846	1,043	1,292	1,664	1,990	2,088	2,374	2,639	3,416
100	0,677	0,845	1,042	1,290	1,660	1,984	2,081	2,364	2,626	3,390
1000	0,675	0,842	1,037	1,282	1,646	1,962	2,056	2,330	2,581	3,300
$\infty$	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,054	2,326	2,576	3,290